

UFRRJ

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO AGROPECUÁRIA**

TESE

**Avaliação da Resistência Antimicrobiana e da
Virulência em Cepas Bacterianas Isoladas de
Aves em Estabelecimentos de Corte e Postura no
Estado do Rio de Janeiro**

Ramon Loureiro Pimenta

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E
INOVAÇÃO AGROPECUÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E DA
VIRULÊNCIA EM CEPAS BACTERIANAS ISOLADAS DE AVES
EM ESTABELECIMENTOS DE CORTE E POSTURA NO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO**

RAMON LOUREIRO PIMENTA

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

e Coorientação da Professora
Shana de Mattos de Oliveira Coelho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, área de concentração em Patobiologia.

Seropédica, RJ
Março de 2018

P664a Pimenta, Ramon Loureiro, 1985 –
Avaliação da resistência antimicrobiana e da virulência em cepas bacterianas isoladas de aves em estabelecimentos de corte e postura no estado do Rio de Janeiro. / Ramon Loureiro Pimenta. - 2018.
60 f

Orientadora: Miliane Moreira Soares de Souza.
Coorientador: Shana de Mattos de Oliveira Coelho.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária , 2018.

1. Colistina. 2. mcr-1. 3. Avicultura. 4. esbl. 5. mecA. I. Souza, Miliane Moreira Soares, 1970-, orient. II. Coelho, Shana Mattos de Oliveira, 1980-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária . IV. Título

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

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

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
EM AGROPECUÁRIA**

RAMON LOUREIRO PIMENTA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária. Área de Concentração em Patobiologia.

TESE APROVADA EM: 08/03/2018

Miliane Moreira Soares de Souza. Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Marcus Fábio. Dr. IF Pinheiral RJ

Raquel Regina Bonelli. Dr. UFRJ

Paulo César Augusto de Souza. Dr. UFRRJ

Márcio Reis Pereira de Sousa. Dr. UFRRJ

“Pois sempre houve espinhos nas rosas de qualquer jardim, e se há calor no ninho, há pedras no caminho que ainda assim é belo”.

Lulu Santos

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por estar sempre ao meu lado me protegendo, dando força nas horas difíceis, iluminando meus caminhos e fazendo com que tome as decisões certas nessa vida.

A minha mãe Vanda Lúcia Loureiro Pimenta, que me conhece apenas pelo tom de voz, que me dá a calma necessária para conseguir transpor todos os obstáculos que surgem pelo caminho. Que sofre com a minha distância física, mas que torce muito pelo meu sucesso.

Ao meu avô Antonio Jorge do Nascimento (*in memorian*) que foi e ainda é o exemplo de integridade, trabalho e honestidade. A minha avó Wanda Loureiro do Nascimento que ajudou a criar eu e meu irmão.

Ao meu irmão Thiago Loureiro Pimenta que mesmo tendo pouca diferença de idade sempre agiu como se fosse meu pai, me protegendo, me ajudando e muitas vezes puxando minha orelha. Além disso me deu uma afilhada linda que amo tanto que não consigo mais imaginar minha vida sem sua presença.

Ao meu tio padrinho Paulo Roberto Loureiro Nascimento por me mostrar como devo agir profissionalmente, pelo exemplo de homem, profissional médico veterinário.

Ao meu pai Evaldo Vianna Pimenta por ter proporcionado as melhores condições possíveis de estudo, moradia e alimentação.

A Leila Gatti Sobreiro que é minha mãe profissional, que fez enxergar a medicina veterinária por um outro prisma e que comemora cada vitória profissional junto comigo.

Ao mar, por ser o meu refúgio nos momentos de tensão. Aos meus amigos Pedro Henrique Teixeira Casemiro, Pedro Morpurgo Kurdian, Saulo Lamonier, Raquel Bitetti, Felipe Rufino, Mariah Gatois, Maria Carolina de França por terem tido paciência comigo e por compreenderem minha ausência nesses últimos quatro anos.

Ao Eduardo Garcia Castro (*in memorian*) por ter aberto meus olhos do que era a UFRRJ em 2003, por ter compartilhado muitos momentos difíceis comigo durante toda a graduação, sem sua ajuda não estaria na UFRRJ, e conseqüentemente, terminando mais essa importante etapa do meu desenvolvimento profissional. Ao Bino (*in memorian*) que me fazia companhia nos dias em que ficávamos sozinhos na república, conhecia o barulho do meu carro mesmo ficando a semana toda fora.

Ao Regis Pouchucq Jr. e Felipe Pouchucq por abrirem as portas dos estabelecimentos e facilitarem o contato com os granjeiros da região de São José do Vale do Rio Preto, sem vocês o projeto não teria sido possível. Ao granjeiro Joaquim (*in memorian*) de São José do Vale do Rio Preto que abriu as portas das suas granjas para o grupo de pesquisa.

A Greiciane França Bronzato de Almeida por ter tido paciência comigo dentro e fora do laboratório, por ter ouvido todas as minhas angústias, por ter ajudado a interpretar os resultados dos meus ensaios. Hoje compreendo o significado da palavra “parceria”.

Ao estagiário Vinicius Salles que desde do início abraçou o projeto como se fosse dele, evoluímos juntos, aprendemos juntos e erramos juntos.

A equipe LABAC-VET Naiara Miranda, Gabrielli Stephanini, Cassia Couto da Motta, Dayanne Melo, Bianca Soares por terem tido paciência comigo e me ensinado os procedimentos de rotina do laboratório necessários para a realização do experimento. Além do Daniel Paiva e Marisol que assim que entrei na pós-graduação, foram minhas babás nos primeiros dias. Aos estagiários Thomas Hebert, Beatriz Farias, D’Artagnan Trepin e Lucas Romanelli.

A professora e coorientadora Shana de Mattos de Oliveira Coelho e Irene da Silva Coelho por terem me ajudado a interpretar meus dados e por terem tido muita paciência comigo durante esses quatro anos.

A professora Virginia Leo, que me ajudou sem me conhecer em 2010 mesmo não tendo sido seu aluno, sempre esteve a disposição para sanar minhas dúvidas e também para puxar minha orelha.

Especialmente a professora Miliane Moreira Soares de Souza, que vem acompanhando meu desenvolvimento profissional desde 2004, inicialmente como coordenadora de curso e agora como orientadora. Muito obrigado por ter acreditado no meu potencial, muito obrigado pela oportunidade, serei eternamente grato por tudo.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, ao programa de Pós-Graduação em Ciências, Tecnologia e Inovação em Agropecuária - PPGCTIAe todo o seu corpo docente e apoio técnico.

A CAPES a concessão da bolsa, sem a mesma não teria a tranquilidade necessária para me dedicar ao programa.

Meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Ramon Loureiro Pimenta, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no ano de 2004, diplomando-se em março de 2010.

Durante a graduação foi monitor por três anos das disciplinas Histologia I, Histologia II e Histologia Básica para os cursos de; Medicina Veterinária, Ciências Biológicas e Zootecnia. Também atuou como estagiário no laboratório de Controle Físico-Químico de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal Fluminense entre 2005 a 2009 sob orientação da professora doutora Eliane Teixeira Mársico.

Entre 2010 e 2011 trabalhou para a empresa Global Breeders em Santa Catarina, onde teve sua primeira experiência com avicultura. Em seguida trabalhou para RICA e abatedouro Dagma onde teve a oportunidade de conhecer todo o ciclo de produção de frango de corte.

Em 2014 ingressou na pós-graduação nível doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária sob orientação da professora doutora Miliane Moreira Soares de Souza.

RESUMO

PIMENTA, Ramon Loureiro. **Avaliação da resistência antimicrobiana e da virulência em cepas bacterianas isoladas de aves em estabelecimentos de corte e postura no estado do Rio de Janeiro**. 2018. 60p. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ: UFRRJ, 2018.

A utilização de antimicrobianos é uma prática muito difundida na avicultura, sendo utilizados de forma profilática, terapêutica ou como aditivos. O uso como aditivo é caracterizado pela adição de baixas doses nas rações, tal prática gera condições para a emergência de cepas bacterianas resistentes. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento proíbe o uso das tetraciclina, β -lactâmicos, sulfonamidas sistêmicas e sulfato de colistina como aditivos, porém, libera a utilização de forma terapêutica. O objetivo do estudo foi verificar a ocorrência de resistência aos antimicrobianos das classes dos β -lactâmicos, polimixinas e glicopeptídeos em isolados de *Escherichia coli*, *Bordetella* spp., *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. oriundos de granjas avícolas do estado do Rio de Janeiro. De acordo com a análise fenotípica e proteômica, foram obtidas 88 cepas do gênero *Staphylococcus* spp. sendo observado no teste de difusão em disco os seguintes perfis de resistência para estes isolados: 14% (12/88) apresentaram resistência apenas a OXA, 10% (9/88) apresentaram resistência a PEN e apenas 1% (1/88) a CFO, enquanto 10% (9/88) foram resistentes a OXA e PEN e 2% (2/88) resistentes a PEN, OXA e CFO. O *primer mecA universal* conseguiu detectar o gene *mecA* em 7% (6/88) das cepas de *Staphylococcus* spp., seguido pelo *primer mec SsciuriInt* e *blaZ* com 6% (5/88) e 1% (1/88) respectivamente. Nenhuma cepa amplificou o gene clássico *mecA* usando a metodologia descrita por Murakami et al. (1991). Ainda nesse estudo foram obtidas 107 cepas de *E. coli*, onde, 71% (76/107) foram resistentes ao SUT e 18% (19/107) foram produtoras de β -lactamases, sendo 58% (11/19) produtoras apenas de ESBL, 10% (2/19) produtoras apenas de AmpC enquanto 26% (5/19) foram produtoras tanto de ESBL quanto de AmpC. O gene *bla-TEM* foi detectado em 15% (16/107) das cepas de *E. coli* e em 20% (4/19) das produtoras de β -lactamases. 95% (102/107) das cepas de *E. coli* mostraram-se resistentes a colistina, sendo o gene *mcr-1* detectado em apenas 58% (62/107), 31% das cepas foram consideradas APEC. Vinte e três cepas foram identificadas como *Bordetella* spp. sendo 74% (17/23) *B. hinzii* e 26% (6/23) *B. avium*. No teste de difusão em disco 94% (16/17) das cepas de *B. hinzii* mostraram-se produtoras de β -lactamase enquanto que as cepas de *B. avium* foram sensíveis aos antimicrobianos testados. Foram obtidas 11 cepas do gênero *Enterococcus* spp. que foram sensíveis à vancomicina. Os resultados demonstram que, apesar da suspensão da utilização dos β -lactâmicos e polimixina como aditivos, elevados níveis de resistência ainda são encontrados a campo. A utilização indiscriminada da forma terapêutica, pode estar contribuindo para a circulação dos genes de resistência nas populações animais, podendo causar futuros problemas de saúde pública e sanidade avícola.

Palavras-chave: Colistina *mcr-1*. Avicultura. ESBL.

ABSTRACT

PIMENTA, Ramon Loureiro. **Evaluation of antimicrobial resistance and virulence in bacterial strains isolated from birds in cutting and laying establishments in the state of Rio de Janeiro**. 2018. 60p. Thesis (Doctorate in Science, Technology and Innovation in Agriculture and Livestock). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ: UFRRJ, 2018.

The antimicrobials use in poultry industry is widely spread for prophylactic and therapeutic purposes and as an additive. For the use as additive, small doses are administered with the ration, leading to emergence of resistant bacterial strains. Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply prohibits the use of Tetracyclines, β -lactams, Systemic Sulfonamides and Colistin Sulfates as additives but allows their use for therapeutic purposes. Therefore, this study aims to verify the resistance levels of the antimicrobial classes of β -lactams, Polimyxins and Glycopeptides in *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Bordetella* spp. and *Enterococcus* in samples from poultry farms of the Rio de Janeiro state. According to Phenotypic and Proteomic analysis 88 strains of the genus *Staphylococcus* spp. were identified, 14% (12/88) presented resistance only to OXA, 10% (9/88) presented resistance to PEN and only 1% (1/88) to CFO, while 10% (9/88) were resistant to OXA and PEN and 2% (2/88) resistant to PEN, OXA and CFO. The *universal mecA* primer was able to detect the *mecA* gene in 7% (6/88) of strains of *Staphylococcus* spp., Followed by the *mec SsciuriInt* primer and *blaZ* with 6% (5/88) and 1% (1/88) respectively. None strain amplified the classical *mecA* gene using the methodology described by Murakami et al. (1991). In this study, 107 strains of *E. coli* were obtained, where 71% (76/107) were resistant to SUT and 18% (19/107) were β -lactamase producers, being 58% (11/19) producing only ESBL, 10% (2/19) producing only AmpC whereas 26% (5/19) produced both ESBL and AmpC. The *blaTEM* gene was detected in 15% (16/107) of the *E. coli* strains and in 20% (4/19) of the β -lactamase producers. 95% (102/107) of the *E. coli* strains were resistant to colistin, but *mcr-1* gene being detected in only 58% (62/107), 31% of strains were considered APEC. 23 strains were identified as *Bordetella* spp. being 74% (17/23) *B. hinzii* and 26% (6/23) *B. avium*. In the disc diffusion test 94% (16/17) of the *B. hinzii* strains showed β -lactamase production whereas the *B. avium* strains were sensitive to the tested antimicrobials. Eleven strains of the genus *Enterococcus* spp. which were susceptible to vancomycin. These results highlight that, despite β -lactams and polimixins use forbiddance as additives, high levels of those antimicrobials may still be found on field and that indiscriminated use of those drugs, even for therapeutic purposes, contributes to high circulation of resistance genes in bacterial population of farm animals, what may lead to future public health problems.

Keywords: Colistin *mcr-1*. Poultry. Farming. ESBL.

RESUMEN AMPLIADO

PIMENTA, Ramon Loureiro. **Evaluación de la resistencia antimicrobiana y de la virulencia en cepas bacterianas aisladas de aves en establecimientos de corte y postura en el estado de Río de Janeiro.** 2018. 60f. Tesis (Doctorado en Ciencia, Tecnología e Innovación Agropecuaria). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2018.

1 Introducción

Brasil es el mayor exportador y el segundo mayor productor de carne de pollo del mundo, quedando atrás sólo de los Estados Unidos de América (USDA, 2017). Entre los principales desafíos del sector están: disminuir los costos de producción y ampliar la productividad, lo que conduce a veces a la elevada densidad en que se alojan los animales. Esta práctica facilita la diseminación de enfermedades infectocontagiosas afectando la conversión alimentaria y, consecuentemente, generando pérdidas económicas para la agroindustria (LOPÉZ & OLVERA, 2000). La utilización de antimicrobianos es una práctica muy difundida en la avicultura industrial a nivel mundial, cuyo uso de este tipo de medicamento se concentra en países con grandes plantones. Estos medicamentos pueden ser utilizados en aves de forma profiláctica, terapéutica o como aditivos. El uso como aditivo, se caracteriza por la adición de estos compuestos en bajas dosis en la ración, con el objetivo de promover el aumento de las tasas de crecimiento a través de la mejora en la eficiencia alimentaria y la conversión alimenticia. Tal práctica genera condiciones perfectas para la emergencia y diseminación de cepas resistentes en animales. El MAPA, a través de las Instrucciones Normativas N ° 26 de 09 de julio de 2009 y IN N ° 45 de 22 de noviembre de 2016, reguló la utilización de los antimicrobianos, tetraciclinas, β -lactámicos, fluoroquinolonas, quinolonas, sulfonamidas sistémicas y sulfato de colistina. Ambas normativas prohíben el uso como aditivos alimentarios y promotores de crecimiento, pero permiten la utilización de forma terapéutica. En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo identificar la microbiota bacteriana presente en muestras de cloaca y traquea de pollos de corte y de postura, investigar la resistencia a los antimicrobianos en las cepas aisladas y detectar la presencia de genes de virulencia y resistencia a los antimicrobianos en las cepas de *Escherichia coli*. Estos datos contribuyen para la comprensión del impacto de estos factores sobre la sanidad animal y de la importancia de la presión de selección positiva en la dispersión de los genes involucrados en la resistencia detectada.

2 Materiales y Métodos

Las muestras fueron recolectadas en dos establecimientos de aves comerciales de corte (1 y 2) ubicados en la microrregión Serrana, y en una granja de postura caipira (3) ubicada en la microrregión de Macaé, en el estado de Río de Janeiro, entre abril de 2015 y marzo de 2016. Se realizaron dos visitas en las granjas de pollo de corte y una en la granja de postura caipira, siendo recogidos en cada visita 15 *swabs* de traquea y 15 *swabs* de cloaca, totalizando 150 *swabs*. Las muestras fueron debidamente acondicionadas y transportadas al Laboratorio de Bacteriología Veterinaria de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro, donde fueron inoculadas en Agar Mac Conkey (MC), Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) y Agar Manitol Rojo de Fenol (AMVF). La técnica proteómica MALDI-TOF fue utilizada en la identificación de las especies, en asociación con el Laboratorio de Investigación en Microbiología Médica del Instituto de Microbiología Paulo Góes (UFRJ). Las cepas provenientes del AMVF que no obtuvieron puntuación suficiente para la identificación en el MALDI-TOF fueron sometidos a los análisis fenotípicos según la metodología de Koneman, 2008. Posteriormente se realizó análisis de selección de resistencia fenotípica por la técnica de difusión en disco

(CLSI, 2014). Para las cepas de *Staphylococcus* spp. se probaron los siguientes antimicrobianos: penicilina (PEN 10 µg), cefoxitina (CFO 30 µg), oxacilina (OXA1 µg), vancomicina (VAN 30 µg) y se sometieron a la detección de los genes *mecA*, *mec SsciuriInt*, *mecA universal* y *blaZ*. Las cepas originarias del MC y EMB se probaron para amoxicilina amoxicilina (AMO 10 µg), amoxicilina + ácido clavulánico (AMC 30 µg), ampicilina (AMP 10 µg), ampicilina con subactam (APS 20 µg), aztreonam (ATM 30 µg), cefalotina (CFL 30 µg), cefepime (CPM 30 µg), cefotaxima (CTX 30 µg), cefoxitina (CFO 30 µg), ceftazidima (CAZ 30 µg), ceftriaxona (CRO 30 µg), ciprofloxacino (CIP 5 µg), gentamicina (GEN 10 µg), imipenem (IMP 10 µg) surfa-trimetoprima (SUT 25 µg) a través de la técnica de difusión de disco, mientras que la investigación fenotípica de la resistencia a la colistina (COL) se realizó en Agar Screen. Las cepas de *E. coli* fueron sometidas a la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de los genes asociados a la resistencia: (*blaTEM*), tetraciclina (*TetA*, *TetB*), sulfonamidas (*Sul1*), trimetropina (*Dfr17*), cuaternario de amonio (*Qac Delta1*), gentamicina (*aac3* y *aph3*), colistina (*mcr-1*), plata (*silP*), proteína D de resistencia al cobre (*pcuD*), aminoglicosido (*aadA*). Posteriormente, se realizó la detección de genes marcadores de grupos de incompatibilidad plasmidial y genes acumuladores y facilitadores de transmisión de genes de resistencia. Para la identificación presuntiva de las cepas APEC se buscaron los genes: receptor de siderofilo Samochelin (*iroN*), codificador de proteasa de membrana externa episomal (*dompT*), codificador de hemolisina putativa de *E. coli* aviar (*hlyF*), de supervivencia al suero (*iss*), receptor de siderofilo aerobactina (*iutA*). En conjunto se realizó la identificación de los grupos filogenéticos usando la técnica de PCR, donde los aislados fueron clasificados en los siguientes grupos: A, B1, B2, C, D, E, F. Por último las cepas de *E. coli* fueron sometidas a técnica de electroforesis en campo pulsado. Las cepas identificadas como *Enterococcus* spp. fueron sometidas a la detección de resistencia en Ágar Screen con vancomicina (6µg / mL).

3 Resultados y Discusión

Se obtuvieron 88 cepas del género *Staphylococcus* spp., donde el 36% (32/88) presentó resistencia a uno o más de los antimicrobianos probados. Los perfiles de resistencia obtenidos en la prueba de difusión en disco fueron los siguientes: 14% (12/88) presentaron resistencia sólo a OXA, 10% (9/88) presentó resistencia a PEN y sólo 1% (1/88) a CFO, mientras que 10% (9/88) fueron resistentes a OXA y PEN y 2% (2/88) fueron resistentes a PEN, OXA y CFO. La presencia de cepas resistentes a la oxacilina en el presente estudio demostró que el 23% (23/88) podrían ser estafilococos coagulasa-negativos resistentes a la meticilina. El gen *mecA universal* fue el prevalente, siendo detectado en el 7% (6/88) de las cepas, seguido por los genes *mec SsciuriInt* y *blaZ* con el 6% (5/88) y el 1% (1/88) respectivamente. Ninguna cepa amplificó para el gen *mecA* de Murakami. La correlación entre los perfiles de resistencia fenotípica presentados por los aislados de *Staphylococcus* spp. y la presencia del gen *mecA* variante fue cero, mientras que de los genes *mecA universal* y *blaZ* fue del 1% (1/88). La correlación entre el *mecA* variante y el *mecA universal* fue del 100% (5/5). Los resultados mostraron que el primer y la metodología descrita por Murakami et al. (1991) no debe utilizarse en la detección del gen *mecA* en poblaciones de aves de producción, similar a lo que ocurre en cepas procedentes de bovinos y porcinos.

De los 175 aislados obtenidos de las granjas comerciales de corte procedentes de MC y EMB, el 61% (107/175) fueron identificados como *E. coli*, 10% (17/175) *Bordetella hinzii* y 6% (11/175) *Enterococcus* spp. Al analizar la resistencia fenotípica frente a los antimicrobianos probados en cepas de *E. coli*, se verificó que la colistina ($\geq 85\%$) presentó altos índices de resistencia en las tres granjas estudiadas, seguido por la SUT, GEN, CIP. La resistencia observada a la AMO pudo estar relacionada con la producción de beta-lactamasa, pues al inter-

pretar los resultados obtenidos en la prueba de difusión en disco 52/107 (48%) fueron sospechosas de producir dicha enzima. El gen de resistencia a antimicrobianos prevaleciente en las cepas de *E. coli* fue el *mcr-1*, puesto que estuvo presente en el 58% (62/107) de las cepas, el 39% (40/102) fueron resistentes en la prueba fenotípica y no presentaron dicho gen. En relación a la resistencia a la gentamicina, hubo correlación de la resistencia fenotípica y genotípica en un 40% (18/45) de las cepas evaluadas. El gen *aadA* fue el más relacionado a la resistencia fenotípica a la gentamicina, pues el 75% (9/12) de las cepas que poseían tal gen expresaron resistencia en la prueba de difusión en disco, seguido por los genes *aac3-VIb* con el 50% (4/8), *aph(3)IA* con 50% (11/22) y *aac3-VIa* con un 38% (5/13). El SUT fue el segundo antimicrobiano con mayor índice de resistencia fenotípica en la prueba de difusión en disco (71%, 76/107), habiendo correlación fenotípica y genotípica en 15,78% (12/76) de las cepas evaluadas. En el caso de las cepas que poseían el gen *sull* y 20/28 (71%) que poseían el gen *dfp-17* presentaron resistencia fenotípica al SUT, sin embargo el 64% (49/76) presentaron resistencia fenotípica y en ninguno de los dos, se detectaron dos genes. El gen *blaTEM* fue detectado en el 15% (16/107) de las cepas de *E. coli*, pero sólo el 25% (4/16) que poseían el gen fueron consideradas productoras de ESBL en las pruebas fenotípicas, esto puede explicarse debido a la existencia de variantes de espectro extendido de dicho gen. En una cepa de *E. coli* se detectó la ocurrencia concomitante de los genes *mcr-1*, *intl1*, *isec12* y plasmídeos *incl2*, *B/O* y *FIB*, tales características demuestran que, dicha cepa, posee una elevada capacidad de transmisión del gen *mcr-1*. En cuanto a la identificación de las cepas de *E. coli* como patógena para aves (APEC) se observó que 31% (33/107) poseían tres o más genes de virulencia concomitantemente, caracterizando las mismas como patógenas para aves. El grupo filogenético prevalente fue B1 con 38% (41/107), siendo 9/33 (26%) de las APEC pertenecientes a dicho grupo. Al evaluar los resultados obtenidos a través de la técnica de *Pulsed-field*, se pudo observar una gran variabilidad genética dentro de las cepas de *Escherichia coli*. La especie *Bordetella hinzii* presentó resistencia a la clase de los beta-lactámicos, quinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas y carbapenemas, teniendo todas las cepas características de producción de beta-lactamasa. No hubo crecimiento de las cepas de *Enterococcus* spp. en medio con vancomicina demostrando de esa forma que dichas cepas fueron sensibles.

4 Conclusiones

Los resultados demuestran que, a pesar de la suspensión de la utilización de los β -lactámicos y polimixina como aditivos, altos niveles de resistencia todavía se encuentran en el campo. La utilización indiscriminada de la forma terapéutica, puede estar contribuyendo a la circulación de los genes de resistencia en las poblaciones animales, pudiendo causar futuros problemas de salud pública y sanidad avícola.

Palabras claves: Colistina *mcr-1*. Avicultura. ESBL.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AFEC- *Escherichia coli* de fezes de aves comensais

AMVF- Agar Manitol Vermelho de Fenol

AMO- Amoxiciclina

AMC- Amoxicilina com ácido clavulânico

AMP- Ampicilina

APS- Ampicilina com subactam

ATM- Aztreonam

AmpC- Betalactamase do tipo C

APEC- *Escherichia coli* patogênica para aves

BHI- Infusão de Cérebro e Coração

BI- Bronquite Infecciosa das Galinhas

B. avium- *Bordetella avium*

B. hinzii- *Bordetella hinzii*

B. bronchiseptica- *Bordetella bronchiseptica*

COL- Colistina

CAZ- Ceftazidima

CFO- Cefoxitina

CFL- Cefalotina

CIP- Ciprofloxacina

CL- Colibacilose

CPM- Cefepime

CTX- Cefotaxima

CRO- Ceftriaxona

CEUA- Comitê de Ética no Uso de Animais

COND- Condrodistrofia

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DM- Doença de Marek

EMB- Eosina Azul de Metileno

ENRA- Enramicina

ENRO- Enrofloxacina

E. cloacae- *Enterococcus cloacae*

E. faecalis- *Enterococcus faecalis*

E. hirae- *Enterococcus hirae*

E. avium- *Enterococcus avium*

EAEC- *Escherichia coli* enteroagregativa
E. coli- *Escherichia coli*
ECP- Estafilococos coagulase positivo
ECN- Estafilococos coagulase negativo
EIEC- *Escherichia coli* enteroinvasora
EHEC- *Escherichia coli* enterohemorrágica
EPEC- *Escherichia coli* enteropatogênica
ETEC- *Escherichia coli* enterotoxigênica
ExPEC- *Escherichia coli* extra-intestinal
ESBL- Betalactamase de Espectro Estendido
FR- Frango de corte
GEN- Gentamicina
h- Horas
IN - Instrução Normativa
IMP- Imipenem
KCl - Cloreto de Potássio
KOH- Hidróxido de Potássio
LPS- Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF- Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz
MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MC- Ágar Mac Conkey
MDRE- *Enterococcus* spp. Resistentes a Múltiplas Drogas
MIT- Micotoxicose
MRSA- *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina
MS- *Mycoplasma sinoviae*
MgCl₂- Cloreto de magnésio
mm- Milímetros
mM- Milimolar
MS- Espectrometria de massa
nm- Nanômetros
NaCl- Cloreto de sódio
PC- postura caipira
PEN- Penicilina
pb- Pares de bases

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE- *Pulsed Field Gel Electrophoresis*
pH- Potencial hidrogeniônico
PNSA- Programa Nacional de Sanidade Avícola
pmol- Picomol
PBP2a PBP2'- Proteína ligante de penicilina
PT- Pulsotipo
OXA- Oxacilina
OTC- Oxitetraciclina
SIGSIF- Sistema de Informações Gerenciais do Serviço de Inspeção Federal
ST- Tipo de sequência
SUT- Sulfa-trimetoprima
S. aureus- Staphylococcus aureus
S. schleiferi- Staphylococcus schleiferi
S. lutrae- Staphylococcus lutrae
S. intermedius- Staphylococcus intermedius
S. delphini- Staphylococcus delphini
S. pseudintermedius- Staphylococcus pseudintermedius
S. intermedius- Staphylococcus intermedius
S. xylosus- Staphylococcus xylosus
S. lentus- Staphylococcus lentus
S. cohnii- Staphylococcus cohnii
S. gallinarum- Staphylococcus gallinarum
S. simulans- Staphylococcus simulans
S. sciuri- Staphylococcus sciuri
UI- Unidade internacional
UPEC- *Escherichia coli* uropatogênica
V- Volts
VAN- Vancomicina
VTEC- *Escherichia coli* verotoxigênica
µm- Micrómetro
µg- Microgramas
µl- Microlitro
°C- Graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema da disposição dos antimicrobianos na placa. 17
- Figura 2** - Prevalência bacteriana de acordo com a origem da amostra 26
- Figura 3** - Gráfico apresentando percentual de resistência das espécies de enterobactérias e *Bordetella* spp. isoladas de cloaca, na granja 1. Legenda: AMO- Amoxicilina, AMC- Amoxicilina com ácido clavulâmico, CFO- Cefoxitina, CIP- Ciprofloxacina, IMP- Imipenem, GEN- Gentamicina, SUT- Sulfa-trimetoprima. 26
- Figura 4** - Gráficos apresentando percentual de resistência das espécies de enterobactérias e *Bordetella* spp. isoladas de cloaca e de traqueia, na granja 2. Legenda: AMO- Amoxicilina, AMC- Amoxicilina com ácido clavulâmico, CFO- Cefoxitina, CIP- Ciprofloxacina, IMP- Imipenem, GEN- Gentamicina, SUT- Sulfa-trimetoprima. 27
- Figura 5** - Gráfico apresentando percentual de resistência das espécies de enterobactérias e *Bordetella* spp. isoladas de traqueia, na granja 1. Legenda: AMO- Amoxicilina, AMC- Amoxicilina com ácido clavulâmico, CFO- Cefoxitina, CIP- Ciprofloxacina, IMP- Imipenem, GEN- Gentamicina, SUT- Sulfa-trimetoprima. 27
- Figura 6** - Gráficos apresentando percentual de resistência das espécies de enterobactérias e *Bordetella* spp. isoladas de traqueia, na granja 2. Legenda: AMO- Amoxicilina, AMC- Amoxicilina com ácido clavulâmico, CFO- Cefoxitina, CIP- Ciprofloxacina, IMP- Imipenem, GEN- Gentamicina, SUT- Sulfa-trimetoprima. 28
- Figura 7** - Gráfico apresentando o percentual de resistência fenotípica nos isolados de *Escherichia coli* de amostras de cloaca e de traqueia nas três granjas. 29
- Figura 8** - Dispersão das cepas consideradas APEC nas diferentes granjas e órgãos avaliados 35
- Figura 9** - Dispersão das cepas consideradas APEC por granja avaliada. 35
- Figura 10** - A coluna "sample" mostra a designação do isolado; A coluna "farm", é a propriedade de origem das amostras a coluna "age", dias ou semanas de idade das aves; "bird" mostra a aptidão da ave; "sample site", órgão de origem da bactéria, e a última coluna Phylo mostra o grupo filogenético. 38
- Figura 11** - Prevalência bacteriana de acordo com a origem da amostra. 39
- Figura 12** - Gráficos apresentando o percentual de resistência das espécies de estafilococos isolados de cloaca na granja 1. Legenda: PEN- penicilina, CFO- Cefoxitina, OXA- Oxacilina, VAN- Vancomicina. 40
- Figura 13** - Gráficos apresentando o percentual de resistência das espécies de estafilococos isolados de traqueia na granja 1. Legenda: PEN- penicilina, CFO- Cefoxitina, OXA- Oxacilina, VAN- Vancomicina. 40
- Figura 14** - Gráficos apresentando o percentual de resistência das espécies de estafilococos isolados de cloaca e na granja 2. Legenda: PEN- penicilina, CFO- Cefoxitina, OXA- Oxacilina, VAN- Vancomicina. 40
- Figura 15** - Gráficos apresentando o percentual de resistência das espécies de estafilococos isolados de cloaca e tr na granja 2. Legenda: PEN- penicilina, CFO- Cefoxitina, OXA- Oxacilina, VAN- Vancomicina. 40

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Descrição do primer degenerado utilizado para amplificação da região 16S rDNA bac-teriano para as estirpes de Enterobactérias..... | 18 |
| Quadro 2 - Descrição dos primers utilizados para detecção dos genes de resistência a antimicrobianos em E. coli..... | 19 |
| Quadro 3 - Descrição das sequências de primers para amplificação de genes de virulência utiliza-dos para formação de perfis genéticos em cepas de E. coli..... | 20 |
| Quadro 4 - Primers utilizados na tipagem filogenética das cepas de E. coli..... | 20 |
| Quadro 5 - Primers utilizados na detecção de plasmídeos, gene facilitador de transmissão e gene de acumulação de resistência em cepas de E. coli..... | 22 |
| Quadro 6 - Iniciadores e referências dos ciclos empregados na amplificação dos genes 16S rRNA de Staphylococcus spp..... | 23 |
| Quadro 7 - Iniciadores e condições de amplificação para a detecção dos genes de resistência me-cA..... | 24 |
| Quadro 8 - Iniciadores e condições de amplificação para a detecção do gene blaZ..... | 24 |
| Quadro 9 - Informações gerais das granjas estudadas..... | 25 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Genes associados a resistência em cepas de <i>E. coli</i> | 32 |
| Tabela 2 - Prevalência dos plasmídeos e dos genes de acúmulo e transmissão de resistência correlacionados com a presença do gene <i>mcr-1</i> em cepas de <i>E. coli</i> | 33 |
| Tabela 3 - Relação de número de cepas positivas para o gene <i>mcr-1</i> em relação aos plasmídeos e aos genes de acúmulo e transmissão de resistência..... | 33 |
| Tabela 4 - Preditores mínimos para APEC..... | 34 |
| Tabela 5 - Prevalência dos grupos filogenéticos em relação a virulência e presença do gene <i>mcr-1</i> | 38 |
| Tabela 6 - Correlação entre perfil de resistência x espécie gênero <i>Staphylococcus</i> spp. | 41 |
| Tabela 7 - Distribuição dos genes codificadores de resistência aos β -lactâmicos em cepas de <i>Staphylococcus</i> spp..... | 42 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 Produção Avícola | 3 |
| 2.1.1 Produção mundial..... | 3 |
| 2.1.2 Produção nacional..... | 3 |
| 2.1.3 Produção estadual - histórico e contexto atual..... | 3 |
| 2.2 Bactérias de Importância em Produção Avícola Cujo Monitoramento Não é Preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento..... | 5 |
| 2.2.1 <i>Escherichia coli</i> | 5 |
| 2.2.2 Importância da <i>E. coli</i> na sanidade avícola..... | 5 |
| 2.2.3 Importância da <i>E. coli</i> na saúde pública..... | 6 |
| 2.2.4 <i>E. coli</i> resistente aos antimicrobianos da classe β -lactâmicos, tetraciclinas, sulfonamidas e quinolonas..... | 7 |
| 2.2.5 <i>E. coli</i> resistente a colistina | 8 |
| 2.2.6 Fatores de virulência relacionados a <i>E. coli</i> | 8 |
| 2.2.7 <i>Staphylococcus spp.</i> | 9 |
| 2.2.8 Importância do <i>Staphylococcus spp.</i> na sanidade avícola | 10 |
| 2.2.9 Importância do <i>Staphylococcus spp.</i> na saúde pública..... | 10 |
| 2.2.10 <i>Staphylococcus spp.</i> resistentes aos antimicrobianos da classe β -lactâmicos e vancomicina..... | 11 |
| 2.2.11 Fatores de virulência relacionados ao <i>Staphylococcus spp.</i> | 12 |
| 2.2.12 <i>Bordetella spp.</i> | 12 |
| 2.2.13 Importância da <i>Bordetella spp.</i> na sanidade avícola | 12 |
| 2.2.14 Importância da <i>Bordetella spp.</i> na saúde pública..... | 12 |
| 2.2.15 <i>Bordetella spp.</i> resistente aos antimicrobianos da classe β -lactâmicos..... | 13 |
| 2.2.16 Fatores de virulência relacionados a <i>Bordetella spp.</i> | 13 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 3.1 Amostragem..... | 15 |
| 3.2 Isolamento e Identificação..... | 15 |
| 3.3 Identificação Proteômica Através da Técnica MALDI-TOF MS | 15 |
| 3.4 Identificação Fenotípica de <i>Staphylococcus spp.</i> | 16 |
| 3.5 Detecção Fenotípica da Resistência aos Antimicrobianos | 16 |
| 3.5.1 Preparo do inóculo..... | 16 |
| 3.5.2 Detecção fenotípica da resistência aos antimicrobianos para enterobacteriaceae e bordetella spp..... | 16 |
| 3.5.3 Pesquisa de β -lactamase em Isolados de <i>E. coli</i> e <i>Bordetella spp.</i> | 16 |
| 3.5.4 Detecção de resistência fenotípica à colistina em <i>Escherichia coli</i> | 17 |
| 3.5.5 Teste de disco difusão para <i>Staphylococcus spp.</i> | 17 |
| 3.5.6 Detecção da resistência à vancomicina por ágar screen em cepas de <i>Enterococcus spp.</i> | 17 |
| 3.6 Detecção Genotípica dos Isolados Avaliados..... | 18 |

| | |
|---|----|
| 3.6.1 Extração do DNA pela técnica de lise térmica para cepas de <i>E. coli</i> | 18 |
| 3.6.2 Ampliação do gene 16S rDNA através da técnica de PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) | 18 |
| 3.6.3 Detecção de genes relacionados a resistência antimicrobiana em <i>E. coli</i> | 18 |
| 3.6.4 Detecção de genes de virulência para formação de perfis em <i>E. coli</i> | 19 |
| 3.6.5 Classificação das cepas de <i>E. coli</i> em grupos filogenéticos | 20 |
| 3.6.6 Análise da diversidade por PFGE (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>)..... | 21 |
| 3.6.7 Digestão de DNA genômico em blocos de agarose | 21 |
| 3.6.8 Eletroforese e coloração do gel de agarose | 21 |
| 3.6.9 Análise dos perfis eletroforéticos | 21 |
| 3.6.10 Detecção de plasmídeos, gene facilitador de transmissão e gene de acumulação de resistência | 22 |
| 3.6.11 Extração do DNA total para cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. | 23 |
| 3.6.12 Caracterização genotípica de <i>Staphylococcus</i> spp. através da técnica de PCR..... | 23 |
| 3.6.13 Detecção de genes de resistência a oxacilina em <i>Staphylococcus</i> spp. | 23 |
| 3.6.14 Detecção do gene relacionado à produção de β -lactamases | 24 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 25 |
| 4.1 Situação Epidemiológica, Sanitária e Infraestrutura das Granjas Visitadas..... | 25 |
| 4.2 Identificação e Suscetibilidade Antimicrobiana de Enterobactérias e <i>Bordetella</i> Spp. Provenientes de Amostras Aviárias | 25 |
| 4.3 Panorama Geral da Resistência Fenotípica | 26 |
| 4.3.1 Panorama da resistência fenotípica antimicrobiana em cepas de <i>E. coli</i> | 29 |
| 4.3.2 Resistência a vancomicina em cepas de <i>Enterococcus</i> spp. | 30 |
| 4.3.3 Análise da produção de β -lactamases em cepas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Bordetella</i> spp. e outras bactérias. | 31 |
| 4.3.4 Detecção de genes relacionados a resistência em cepas de <i>E. coli</i> | 31 |
| 4.3.5 Capacidade de acumulação de genes de resistência e risco de transmissão para outras bactérias | 32 |
| 4.3.6 Detecção de genes relacionados a virulência em cepas de <i>E. coli</i> | 34 |
| 4.3.7 Variabilidade genética das cepas de <i>Escherichia coli</i> | 36 |
| 4.3.8 Grupos filogenéticos de <i>Escherichia coli</i> | 38 |
| 4.3.9 Identificação e suscetibilidade antimicrobiana de <i>Staphylococcus</i> Spp. | 39 |
| 5. CONCLUSÕES | 43 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 44 |
| 7. ANEXOS | 58 |

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador e o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América (USDA, 2017). Em média, 66% da produção nacional abastece o mercado interno, sendo os outros 34% exportados (ABPA, 2017). A demanda interna é elevada devido ao seu baixo custo e teor de gordura, sendo a carne mais acessível para a parcela menos favorecida da população. Tais características fizeram com que o consumo *per capita* em 2016 fosse de 41,10 Kg (ABPA, 2017).

Entre os principais desafios do setor estão: diminuir os custos de produção e ampliar a produtividade, o que acarreta, por vezes, a elevada densidade nas quais os animais são alojados. Essa prática facilita a disseminação de doenças infectocontagiosas afetando a conversão alimentar e, conseqüentemente, gerando perdas econômicas para a agroindústria (LOPÉZ & OLVERA, 2000).

Com relação ao monitoramento de agentes bacterianos, atualmente, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) preconiza, através da Instrução Normativa N°78 de 03 de novembro de 2003, o monitoramento permanente a cada três meses nas linhas puras, bisavós, avós e matrizes, para *Salmonella Pullorum*, *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis*. Além das Salmoneloses, outro agente bacteriano monitorado pelo MAPA é o *Mycoplasma spp.*, através da Instrução Normativa N° 44 de 23 de agosto de 2001 que descreve as normas Técnicas para o Controle e a Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*. A Instrução Normativa N°56 de 04 de dezembro de 2007 (IN-56) legisla sobre a implantação de medidas de biossegurança, tais como o uso de malhas de até uma polegada, desinfecção de veículos, controle de entrada e saída de veículos e pessoas, entre outras. As granjas de frango de corte registradas ou não no serviço veterinário oficial estadual, assim como os abatedouros, deve monitorar os lotes para *Salmonella spp.* conforme descritos nas Instruções Normativas N° 20 de 21 de outubro de 2016 e N°10 de 11 de abril de 2013.

Devido às grandes perdas e ao risco à saúde pública, as enfermidades bacterianas devem ser monitoradas constantemente, mesmo as que não fazem parte do Programa Nacional de Sanidade Avícola (BRASIL, 1994). Dados obtidos no SIGSIF analisados por Oliveira e colaboradores (2016) no período entre 2006 a 2011 mostraram que 5,99% de carcaças de aves foram condenadas em todo o Brasil, das quais 85% parcialmente e 15% totalmente condenadas. As causas das condenações e suas frequências respectivas foram: 8,3% por celulite, 6,3% por artrite, 2,6% por aerossaculite e 1,4% por lesões supuradas. Tais lesões estão entre as dez principais causas de condenações e podem estar associadas a alguma enfermidade bacteriana, como descrito por Fard et al. (2007) que ao analisar 80 carcaças suspeitas de celulite, obteve 72 (90%) isolados de *Escherichia coli* e 5 (6,25%) de *Staphylococcus aureus*.

Além do monitoramento constante dos lotes em relação à presença de agentes bacterianos preconizados pelo MAPA ou de outros potencialmente patogênicos, a utilização indiscriminada de antimicrobianos no ambiente de produção avícola também tem sido alvo de regulamentações do MAPA e da comunidade econômica mundial. A Instrução Normativa N° 9 de 27 de junho de 2003 proíbe a fabricação, manipulação, fracionamento, comercialização, importação e o uso dos nitrofuranos e cloranfenicol (BRASIL, 2003). A Instrução Normativa N° 26 de 09 de julho de 2009 regulamenta a proibição da utilização das substâncias anfenicóis, tetraciclina, β -lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações), fluoroquinolonas, quinolonas e sulfonamidas sistêmicas, como aditivos alimentares e promotores de crescimento (BRASIL, 2009). E a Instrução Normativa N° 14 de 17 de maio de 2012 proíbe a importação, fabricação e o uso da espiramicina e eritromicina como aditivo zootécnico.

co melhorador de desempenho na alimentação animal (BRASIL, 2012). Recentemente com a emergência em nível mundial da resistência a colistina mediada pelo gene *mcr-1*, o MAPA publicou duas instruções normativas, a IN N°45 de 22 de novembro de 2016 que regulamenta o uso da colistina apenas como alternativa terapêutica proibindo seu uso como promotor de crescimento e a IN N° 41 de 23 de outubro de 2017 que institui o Programa de Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos na Agropecuária.

Mediante este contexto, o objetivo geral do estudo foi identificar a microbiota bacteriana presente em amostras de cloaca e traqueia de frangos de corte e de postura, pesquisar a resistência aos antimicrobianos nas cepas isoladas e detectar a presença de genes de virulência e resistência aos antimicrobianos nas cepas de *Escherichia coli*.

Os objetivos específicos do estudo foram:

- Avaliar as condições higiênico sanitárias e estruturais das instalações de produção.
- Isolar e identificar fenogenotipicamente as espécies de *Staphylococcus* spp., *Bordetella* spp. e família Enterobacteriaceae circulantes em ambientes de produção avícola.
- Identificar o perfil de resistência fenotípica a antimicrobianos selecionados em cepas de *Staphylococcus* spp., *Bordetella* spp. e Enterobacteriaceae, *Enterococcus* spp.
- Identificar genes codificadores de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos em cepas de *Staphylococcus* spp.
- Identificar a presença de genes codificadores de resistência a diferentes antimicrobianos em *E. coli*.
- Identificar a ocorrência de genes de virulência relacionados à adesão e produção de toxinas em cepas de *Escherichia coli*.
- Agrupar as cepas de *E. coli* em grupo filogenéticos.
- Identificar as cepas de *E. coli* patogênica aviária (APEC).
- Identificar os grupos de incompatibilidade plasmidiais prevalentes nas cepas de *E. coli*.

O presente trabalho aborda a identificação da resistência antimicrobiana e a análise dos fatores de virulência em cepas bacterianas oriundas de ambiente de produção avícola no estado do Rio de Janeiro como subsídio para à compreensão do impacto destes fatores sobre a sanidade animal e da importância da pressão de seleção positiva na dispersão dos genes envolvidos na resistência detectada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção Avícola

2.1.1 Produção mundial

No mundo a segunda carne mais consumida é a de frango representando 34,34% da produção mundial conforme demonstra o gráfico 1. Entre os diferentes países os Estados Unidos são os maiores produtores e maiores consumidores de carne de frango, sozinhos são responsáveis por 20,62% da produção e 17,67% do consumo mundial, o Brasil, por sua vez, é o segundo maior produtor deste tipo de carne com 14,59%, e o quarto maior consumidor com 10,49% conforme gráficos 2 e 3. A produção de frangos chinesa sofreu retração de 8% em 2016 e 6% em 2017 devido a ocorrência de Influenza Aviária de Alta Patogenicidade naquele país. Tal ocorrência beneficia o Brasil, que até 2010 possuía menos de 40% do mercado chinês, mas em 2016 estava próximo dos 90% sendo que para 2018 há expectativa de manutenção do mercado (USDA, 2017).

2.1.2 Produção nacional

O produto interno bruto nacional fechou o ano de 2016 em R\$ 6,3 trilhões, com quedas significativas na indústria (3,8%), serviços (2,7%) e setor agropecuário (6,6%) (IBGE, 2017). O complexo carnes correspondeu a 5,96% das exportações brasileiras de janeiro a novembro de 2017, sendo, 2,8% apenas de carne de frango (BRASIL, 2017). O setor emprega 3,6 milhões de pessoas diretamente em matadouros frigoríficos, criações a campo, entreposto de ovos, fábricas de ração, fábricas de produtos não comestíveis. Indiretamente movimentando outros setores como; produção de soja, milho, farmacêutico e de máquinas (UBABEF/ABPA, 2016).

Os principais estados brasileiros produtores estão localizados na região Sul e possuem perfil exportador, são eles; Paraná que é responsável por 33,46% da produção, Santa Catarina responsável por 16,06% e Rio Grande do Sul por 14,11%. Os estados da região sudeste possuem perfil de produção para consumo no mercado interno, sendo; São Paulo o principal produtor, responsável por 9,33% da produção nacional, seguido por Minas Gerais (7,88%) e Espírito Santo (0,60%) (ABPA, 2017). Nos últimos anos a região Centro-Oeste vem ganhando destaque na criação de aves para abate devido à proximidade da produção de grãos (UBABEF, 2016).

A organização setorial geralmente funciona com o matadouro frigorífico sendo a figura central, trabalhando em regime de integração com pequenos produtores. A empresa fornece ração, assistência médico veterinária e os pintinhos e, em contrapartida, o produtor tem a certeza da venda dos animais ao final do ciclo de produção (ABPA, 2016). Para acompanhar a grande demanda pela carne de frango, aspectos da produção como melhoramento genético, nutrição, sanidade e manejo estão expandindo no mercado e fornecem subsídios para o crescimento exponencial do setor aviário (BRASIL, 2009; FUKAYAMA et al., 2005). Segundo Castro (2010), o Brasil possui os melhores índices de produtividade e sanidade do mundo.

Em 2016 o Brasil exportou, em média, 4.384 mil toneladas de carne de frango gerando uma receita de 6.848 milhões de dólares. Os produtos avícolas nacionais tiveram como principais destinos o Oriente Médio e a Ásia (ABPA, 2017).

2.1.3 Produção estadual - histórico e contexto atual

Historicamente, a produção avícola nacional teve seu berço na época da colonização portuguesa, quando as primeiras aves foram trazidas ao Brasil para as regiões litorâneas, onde está compreendido também o Rio de Janeiro. Com a vinda da família real para o Brasil, em 1806, o consumo da carne de galinhas e frangos foi difundido, pois seus integrantes eram

grandes apreciadores desse tipo de carne. Nos primórdios essas aves eram mestiças, produto de cruzamentos ao longo dos séculos, e povoavam os quintais das casas brasileiras. A avicultura se desenvolveu, primeiramente, nas cidades litorâneas e de forma artesanal. Com o crescimento econômico e populacional de cidades do interior, graças principalmente ao ciclo de mineração do ouro, maiores necessidades de alimentação estimularam a produção com fins comerciais. Os primeiros estudos que foram conduzidos no Brasil foram realizados no estado do Rio de Janeiro e tiveram como objetivo, selecionar entre as aves importadas, a que melhor se adaptaria e daria maior retorno econômico aos criadores brasileiros. Tais estudos foram realizados pela empresa Leste Basse-Cour em 1895 (UBABEF, 2011).

O Brasil, porém, crescia muito rapidamente e, graças a pioneiros como Delgado de Carvalho e J. Wilson da Costa, que estudaram técnicas de manejo europeias e norte-americanas, foram lançadas as bases de uma verdadeira avicultura industrial para atender à expansão populacional brasileira. Em 1913 foi fundada em São Paulo a Sociedade Brasileira de Avicultura, com regimento inspirado na *American Poultry Association* e a partir daí a avicultura galgou mais um degrau para o seu desenvolvimento. Foram criadas em certos estabelecimentos avícolas, por iniciativa de seus proprietários, escolas práticas de avicultura, a exemplo da Ascurra Basse-Cour, do Rio de Janeiro, entre outras. Iniciava-se a preocupação com a qualidade do produto a ser oferecido aos consumidores (UBABEF, 2011).

Os anos 30 foram marcados pela modernização da economia brasileira e, consequentemente, também para a avicultura no país. O setor já era visto como uma boa fonte de riqueza para o Brasil quando o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ajudou a aperfeiçoar a produção. Um dos seus investimentos foi a construção da estação de avicultura na Escola Nacional de Agronomia, em Seropédica (RJ). Ao mesmo tempo, organizava-se no Rio de Janeiro a Cooperativa Nacional de Avicultura, com o objetivo de instalar cooperativas dessa indústria em todo o território nacional, o que representou um grande passo para o desenvolvimento da produção e do comércio de galinhas e de ovos no país (UBABEF, 2011).

São José do Vale do Rio Preto sofreu retrocesso econômico devido à queda do ciclo do café entre os anos de 1888 e 1920, com isso, abriu-se espaço para um novo ciclo econômico, onde a avicultura foi responsável pela retomada do desenvolvimento da região. A avicultura no município se desenvolveu tanto que a cidade foi considerada o maior centro avícola da América do Sul nas décadas de 50 e 60. A criação de aves para corte e postura ajudou no desenvolvimento de outros municípios da região serrana do Rio de Janeiro, pois os resíduos da criação das aves eram utilizados como adubo na agricultura (IBGE, 2016).

A importação de linhagens dos Estados Unidos no início dos anos 1960, para corte e postura, aprimorou o plantel avícola brasileiro e contribuiu decisivamente para consolidar o caráter industrial dessa atividade no país (UBABEF, 2011).

Atualmente, embora o estado do Rio de Janeiro não esteja no mapa de abate de frangos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a criação de frango de corte é uma das principais atividades econômicas de sua região serrana, junto com a produção de hortaliças e leguminosas (BRASIL, 2018; ABPA, 2017; IBGE, 2014). É notório que a produção fica limitada ao consumo interno do estado, o que acarreta a ausência de abatedouros que estejam registrados junto ao Serviço de Inspeção Federal. Isto pode explicar a dificuldade observada na captação de dados de produção e a existência de granjas não registradas junto ao Serviço de Defesa Animal do Estado (SIAPEC-RJ, 2018; BRASIL, 2018).

Este cenário histórico e a importância da avicultura para a economia da região serrana justifica o desenvolvimento de projetos que ampliem a compreensão das suas fragilidades no que diz respeito ao monitoramento sanitário e a circulação de genes de resistência, considerando a utilização deste ambiente por décadas para esta finalidade.

2.2 Bactérias de Importância em Produção Avícola Cujo Monitoramento Não é Precognizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

2.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, caracterizada como bacilo Gram negativo, anaeróbico facultativo, o qual faz parte da microbiota entérica dos mamíferos e da maioria das aves. *E. coli*, é mesófila sendo capaz de desenvolver-se em temperaturas que variam de 18°C a 44°C, porém sua temperatura ótima de crescimento está entre 37°C a 41°C. Seu tamanho varia de 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm e produzem colônias de formas lisas ou rugosas em meio sólido, sendo possível o aparecimento de colônias mucoides. Além disso, fermenta a lactose, com produção de ácido e gás após a fermentação de maltose, glicose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramnose, arabinose e sorbitol pela maioria das amostras (KONEMAN et al., 2012). As cepas patogênicas de *E. coli* são divididas, de acordo com os sintomas clínicos e os mecanismos da patogenicidade, em diferentes grupos que podem variar em seus períodos de incubação e duração da enfermidade (FORSYTHE & STEPHEN, 2010).

A tipagem sorológica é largamente empregada para a caracterização de *E. coli*, sendo o utilizado esquema de Kauffmann que classifica os sorotipos de acordo com os antígenos que as cepas apresentam. O método de sorotipagem mais frequentemente empregado baseia-se na pesquisa dos antígenos somático (O), flagelar (H), capsular (K) e fimbrial encontrados em estruturas presentes na superfície das células bacterianas classificando este agente em sorogrupo e sorotipos (FRANCO, 2002; NATARO & KAPER, 1998). O antígeno somático (O) é termoestável (121°C por 2 horas) e está relacionado com uma cadeia de polissacarídeo de membrana externa que se projeta para o espaço extracelular. É um constituinte importante do LPS (lipopolissacarídeo), em conjunto com o lipídeo A e o core, fração intermediária composta por oligossacarídeo que liga covalentemente o lipídeo A ao antígeno somático. O LPS é liberado na multiplicação bacteriana e possui um papel importante no processo inflamatório. O antígeno flagelar (H) é termolábil (100°C por 30 min) e possui estrutura de natureza proteica, já o antígeno capsular (K) é termoestável e está relacionado com polissacarídeos capsulares. O antígeno fimbrial (F) forma um quarto sistema de sorotipagem, especificamente para as cepas que apresentam essas estruturas e são importantes na patogênese (FRANCO, 2002; NATARO & KAPER, 1998). Além disso, são utilizados como antissoros, estando disponíveis apenas para um grupo reduzido de cepas (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005; BERTSCHINGER & FAIRBROTHER, 1999).

A função dos antígenos somáticos ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que determinados grupos somáticos (O) possuem correlação com fatores de virulência, como produção de toxinas (EVANS et al., 1997). A produção de fatores de virulência e os mecanismos pelos quais esses fatores levam a uma doença, permitem a classificação das cepas de *E. coli* patogênicas em grupos ou patótipos. Os patótipos de *E. coli* que ocorrem em humanos são divididos em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* extra-intestinal (ExPEC). Em aves, há ainda definido um patótipo *E. coli* patogênica aviário (APEC) (CROXEN & FINLAY, 2010).

2.2.2 Importância da *E. coli* na sanidade avícola

Existem cepas de *E. coli* que são capazes de causar doença extraintestinal em aves, essas cepas são denominadas APEC (*Avian pathogenic E. coli*) e pertencem ao sorogrupo ExPEC. A APEC é o agente etiológico da colibacilose, podendo a doença apresentar-se de duas formas: aguda, que é caracterizada por septicemia e elevada mortalidade, e subaguda, sendo caracterizada por hepatite, pericardite, aerosaculite, salpingite e postura interna em poedeiras

(HUJA et al., 2015, 2014; HOUSDEN & KLANTHOUS, 2012; HANCOCK et al., 2008; GUILVOUT et al., 1995). Estima-se que de 15 a 20% das amostras que compõem a microbiota de aves podem ser consideradas potencialmente patogênicas por possuírem determinados fatores de virulência capazes de causar doença (FERREIRA & KNOBL, 2009).

A colibacilose além de possuir elevada prevalência, causa elevada mortalidade e condenações nos abatedouros, levando a grandes perdas a agroindústria nacional, como observado por Ferreira e colaboradores (2012). Estes autores, ao analisarem os dados da Coordenadoria de Inspeção de Produtos de Origem Animal, apontaram a colibacilose (19,76%) como a principal causa das condenações de carcaças de aves ocorridas no ano de 2010 no Rio Grande do Sul.

2.2.3 Importância da *E. coli* na saúde pública

A similaridade genética entre APEC e *Escherichia coli* Uropatogênicas (UPEC) sugere uma origem ancestral comum. Este fato fez surgir hipóteses de que os animais de produção pudessem atuar como reservatórios de estirpes potencialmente patogênicas para humanos, reforçando a ideia de que as doenças causadas por cepas patogênicas seriam zoonoses (BERGERON et al., 2012; CHASETOPPING et al., 2012; CROXEN et al., 2010).

Existem vários sorogrupos de *E. coli* que estão envolvidos em intoxicações, toxinfecção ou infecção em humanos, são eles: A EHEC que é responsável por causar diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica (HUS) e púrpura trombótica trombocitopênica. Esse grupo inclui a *E. coli* produtora de shigatoxina (STX-I e STX-II), sorovares O157:H7, O26:H11 e O111:NM. A ETEC que tem sido conhecida como causadora da diarreia dos viajantes. Além disso, esse patótipo causa diarreia aquosa, com aparência similar a água de arroz, e produz febres baixas. As cepas de ETEC produzem dois tipos de enterotoxinas: uma do tipo cólera, chamada de toxina termolábil (LT), e uma segunda toxina diarreica denominada toxina termoestável (ST). Toxinas termoestáveis são definidas como aquelas capazes de manter atividade após o tratamento térmico a 100°C por 30 minutos. Permitindo a colonização do microrganismo na parte proximal do intestino delgado. Já a EPEC promove quadros de diarreia aquosa em crianças. Esse patótipo também é capaz de causar vômitos, febre e diarreia aquosa contendo muco, porém não sanguinolenta. Nestes casos, o microrganismo coloniza as microvilosidades de todo o intestino e produz lesão característica de adesão e desaparecimento (“*attaching and effacing*”; A/E) nas bordas da microvilosidade (FORSYTHE & STEPHEN, 2010).

A EAEC (ou EAaggEC) é capaz de causar diarreia aquosa persistente, sobretudo em crianças, com duração superior a 14 dias. Esse microrganismo alinha-se em fileiras paralelas descritas como “empilhamento de tijolos”, tanto em tecidos celulares quanto em lâminas, promovendo uma aderência agregada (AA). A EAEC produz uma toxina termossensível relacionada antígenicamente à hemolisina, mas que não é hemolítica, e uma toxina termoestável codificada por um plasmídeo (EAST1) sem qualquer relação com a enterotoxina termoestável da ETEC. A premissa é que a EAEC fique aderida à mucosa intestinal e produza as enterotoxinas e citotoxinas, as quais resultam em diarreia secretória e em danos a mucosa. Essa bactéria tem sido associada a má nutrição e retardo de crescimento, na ausência de diarreia. As cepas de EIEC colonizam o colo e causam febre e diarreias profusas contendo muco e sangue. Além disso, contém um plasmídeo de 120 a 140 mD responsável pela inatividade, o qual carrega todos os genes necessários para virulência. Por fim a EAEC, que tem sido associada com diarreia em alguns estudos, mas não de forma consistente (FORSYTHE & STEPHEN, 2010).

Existem relatos na literatura de infecções naturais em galinhas e perus por cepas de *E. coli* do clássico sorotipo entero-hemorrágico O157:H7, produtor da toxina Stx (HEUVELINK et al., 1999; PILIPCINEC et al., 1999). Embora o risco sanitário representado por amostras diarreinogênicas pareça pouco representativo no Brasil, os profissionais envolvidos na cadeia

de produção de produtos de origem aviária devem estar alertas para os riscos relacionados as amostras extra-intestinais (ExPEC). A similaridade da estrutura clonal de estirpes APEC com as de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) e *E. coli* meningite neonatal (NMEC) humanas, pode sugerir que as aves atuem como reservatórios de ExPEC (BERGERON et al., 2012; KARIYAWASAM et al., 2007).

2.2.4 *E. coli* resistente aos antimicrobianos da classe β -lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas e quinolonas

Além das perdas econômicas que as infecções provocadas pela *Escherichia coli* causam às indústrias, também deve ser considerado o potencial de disseminação de genes de resistência associado a este microrganismo. Em 2015, Koga e colaboradores, ao pesquisarem a ocorrência de *E. coli* produtoras de β -lactamase em carcaças de frango no estado do Paraná em 2013, verificaram que, 65% das carcaças estudadas possuíam *E. coli* produtora de β -lactamase do tipo ESBL. A detecção de *E. coli* produtoras de β -lactamase não tem sido um problema apenas no Brasil, ocorrendo em diversos outros países, como observado por Dierikx et al. (2013), que ao monitorar vinte e seis granjas na Holanda, encontrou a presença de *Escherichia coli* produtoras de ESBL (β -lactamase de espectro estendido) e AmpC provenientes de cloaca de aves e trabalhadores das fazendas, todas as granjas apresentaram cepas produtoras de β -lactamase, assim como, 33% (8/18) dos trabalhadores. Os resultados encontrados por Dierikx et al. (2013) foram semelhantes aos de Smet et al. (2008) na Bélgica e ao de Mesa et al. (2006) na Espanha, mostrando que aves podem ser reservatórios de *E. coli* produtoras de β -lactamase. A disseminação de cepas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos dificulta o tratamento de infecções no homem, provocando problemas de saúde pública.

Tetraciclina é um antibiótico de largo espectro que atua bloqueando a síntese proteica (ROBERTS et al., 1996). Estudos tem mostrado diferentes prevalência da resistência a tetraciclina entre cepas de *E. coli* provenientes de humanos e animais. Brayan et al. (2004) achou 47% de prevalência de resistência a tetraciclina em cepas oriundas de frangos, enquanto Miles (2006) achou 82,2% e 43,8% em cepas de *E. coli* isoladas de aves e humanos respectivamente. Jones & Ricke (2003), examinaram a resistência antimicrobiana em isolados de *E. coli* obtidos de aves com colisepticemia e foi observado que, 17,1% das cepas foram resistentes a sulfonamidas e tetraciclina.

As quinolonas, são antimicrobianos bactericidas que inibem a atividade catalítica da DNA girase bacteriana (Topoisomerase II) e Topoisomerase IV, que são essenciais para a replicação e transcrição do DNA bacteriano (SHARMA et al., 2009). Durante os últimos anos, elevadas taxas de resistência a quinolonas foram observadas em cepas de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* oriundas de infecções urinárias e intra-abdominais em humanos (SALLES et al., 2013). Tais resultados se repetem em isolados de origem animal, como observado por Bezerra et al. (2016), que ao estudar cepas de *E. coli* oriundas de frango de corte da região nordeste do Brasil obteve 91,4% de cepas resistentes a ciprofloxacina.

As sulfonamidas são antimicrobianos que possuem efeito bacteriostático e atuam inibindo o metabolismo do ácido fólico (ANVISA, 2007). Braga et al. (2016) verificou que 30% das cepas de *E. coli* envolvidas em casos de osteomielite e artrite obtidas entre 2012 e 2014 em Minas Gerais apresentaram resistência a sulfonamida com trimetopina. Enquanto Bezerra et al. (2016), ao estudar o mesmo agente na região nordeste do Brasil, observou a ocorrência de resistência ao referido antimicrobiano em 100% das cepas isoladas.

Para a utilização dos β -lactâmicos, sulfonamidas e tetraciclina em animais de produção o MAPA em 2009 lançou a IN-26 de 09 de julho de 2009, onde proibiu a utilização das referidas drogas como aditivos alimentares e liberando a utilização na forma terapêutica (BRASIL, 2009).

2.2.5 *E. coli* resistente a colistina

A colistina é um antimicrobiano de amplo espectro da família das polimixinas que atuam sobre Gram negativos, incluindo muitas espécies da família *Enterobacteriaceae*. As duas polimixinas usadas de forma terapêutica atualmente são polimixina B e polimixina E, onde a diferença é a substituição do aminoácido fenilalanina da polimixina B pela leucina na polimixina E (BRASIL, 2007).

A colistina foi muito utilizada como promotor de crescimento em todo o mundo e também no Brasil. No entanto, também tem importante uso médico pois devido ao aumento do isolamento de cepas da família *Enterobacteriaceae*, produtora de enzimas carbapenemase como a KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2) e NDM-1 (New Delhi metallo- β -lactamase-1), resultou no aumento do uso da colistina em humanos (CDDEP, 2015; MUNOZ et al., 2013; KUMARASAMY et al., 2010).

Por muitos anos a resistência a colistina não foi considerada problema porque a resistência clínica era cromossomal e restrita aos hospitais, até a descoberta do *mcr-1*. O gene *mcr-1* codifica a resistência à colistina, promovendo a modificação do lipídio A, diminuindo dessa forma a afinidade do antimicrobiano pelo seu alvo. Em 2015, Liu e colaboradores, descobriram que o gene *mcr-1* estava presente em um plasmídeo pela primeira vez. Tal plasmídeo, designado de pHNSHP45, que é um plasmídeo do tipo IncI2 possui elevada capacidade de transmissão *in vitro* entre cepas de *Escherichia coli* e poderia ser transmitido para a *E. coli* ST131 e *Klebsiella pneumoniae* ST11, bem como para *Pseudomonas aeruginosa*, sugerindo também que o *mcr-1* poderia disseminar-se rapidamente entre os patógenos humanos. O plasmídeo do tipo IncI2 possui importância epidemiológica na China, em outros lugares do mundo existem descrições da ocorrência do gene *mcr-1* nos plasmídeos dos tipos IncI2, IncHI2 e IncX4 enquanto no Brasil o prevalente é o IncX. (YANG et al., 2017; FERNANDES et al., 2017).

Acredita-se que, independentemente da pressão de seleção, o plasmídeo contendo o gene *mcr-1* será mantido em populações da família *Enterobacteriaceae*, facilitando a disseminação na população humana. A elevada prevalência do gene *mcr-1* em *Escherichia coli* oriundas de cortes cárneos (14,9%) e em aves (4,9% a 28%) sugere que o gene está disseminado em animais de produção na China, porém possui baixa prevalência em cepas humanas. Dessa forma, acredita-se que a resistência à colistina mediada pelo gene *mcr-1* foi gerada em animais de produção e subsequentemente transmitida ao homem pois, tal antimicrobiano raramente é utilizado em humanos (LIU et al., 2015). A preocupação de disseminação do gene através do plasmídeo levou a proibição do seu uso como promotor de crescimento no Brasil. A IN-45 de 22 de novembro de 2016, proibiu o uso como aditivo e liberou o uso na forma terapêutica ou profilática (BRASIL, 2016).

2.2.6 Fatores de virulência relacionados a *E. coli*

Para que *E. coli* cause a colibacilose é necessário que a cepa envolvida possua fatores de virulência, como adesinas, invasinas, toxinas, sistema de captação de ferro (sideróforos), que estão envolvidas na colonização, adesão, invasão e sobrevivência no hospedeiro (GHU-NAIM et al., 2014; JEONG et al., 2012).

Em estudo recente foi observado que os sorotipos mais frequentes entre as cepas APEC foram O78 (57,58%), O2 (4,55%) e O18 (3,03%), apontando que o sorotipo não pode ser considerado de modo isolado para um diagnóstico efetivo por não refletir a virulência das cepas (PAIXÃO et al., 2016). Dessa forma, o emprego de técnicas moleculares para detecção de genes que permitam a caracterização da virulência bacteriana tem permitido avanços nestas análises (NAKAZATO et al., 2009).

Johnson e colaboradores (2008) ao estudarem a prevalência de 46 genes de virulência em cepas APEC e AFEC (*Avian fecal comensal*), observaram que a prevalência do gene de virulência receptor de siderófilo Samochelin (*ironN*), gene codificador de protease de membrana externa episossomal (*dompT*), gene codificador de hemolisina putativa de *E. coli* aviária (*hlyF*), gene de sobrevivência ao soro (*iss*), e gene receptor de siderofilo aerobactina (*iutA*) foram elevados nas cepas APEC e baixos nas AFEC. As cepas AFEC possuíam apenas um ou dois genes, enquanto as cepas APEC possuíam três ou mais, mostrando que a presença em conjunto desses genes pode ser utilizada para identificação de cepas patogênicas para aves.

A aquisição de ferro protege a bactéria contra a imunidade humoral e a acumulação desses genes é um fator de risco em potencial para a infecção pela APEC (PAIXÃO et al., 2016; JANBEN et al., 2001). A apresentação de mais de um gene relacionado ao ferro pode permitir a sobrevivência das cepas APEC em condições diferentes, sugerindo que estas proteínas de aquisição de ferro tenham um importante papel na patogenicidade das cepas, especialmente nas septicemias causadas por bactérias.

A habilidade de sobreviver e crescer no soro, onde a concentração de ferro é extremamente baixa, parece ser determinante para as cepas APEC, influenciando diretamente na sua patogenicidade (GAO et al., 2012). Os determinantes genéticos envolvidos com a patogenicidade das cepas APEC ainda não estão totalmente esclarecidos (MULATA et al., 2016).

2.2.7 *Staphylococcus spp.*

Bactérias do gênero *Staphylococcus*, pertencente à família *Staphylococcaceae*, são caracterizadas como cocos Gram positivos e tendem a formar grupamentos em arranjos semelhantes a “cachos de uva”. Geralmente as colônias possuem coloração branca, opacas e com mais de 4 mm de diâmetro, e em ágar sangue de carneiro pode ser observada hemólise. A maioria são aeróbios facultativos, halotolerantes, produtores da enzima catalase, imóveis, oxidase negativos e não formadores de esporos. O gênero *Staphylococcus* está presente na pele e microbiota nasal, causando infecções oportunistas em seres humanos e vários animais (SASAKI et al., 2010). Colonizam as mucosas, especialmente de mamíferos e aves, onde eventualmente podem ocasionar um processo infeccioso em decorrência de alterações teciduais do hospedeiro, como traumas (GRIFFETH et al., 2008). Infecções estafilocócicas estão entre as doenças oportunistas mais comuns, o que tem levado a práticas de controle dos patógenos deste gênero, tanto em hospitais veterinários quanto em humanos (WEESE et al., 2012).

O gênero *Staphylococcus* é subdividido em dois grandes grupos: coagulase-positivos (ECP) e coagulase-negativos (ECN). Os ECP produzem a coagulase, enzima que leva a formação de coágulos de fibrina no tecido do hospedeiro, dificultando seu reconhecimento e fagocitose por parte do sistema fagocitário mononuclear. Outras espécies de estafilococos que não produzem a enzima coagulase são denominados de ECN. A produção de coagulase está relacionada a patogenicidade, onde algumas espécies do gênero têm causado várias doenças devido a produção de uma série de enzimas e toxinas, invasão de células e tecidos do hospedeiro, e sua habilidade de escapar do sistema imunológico (MURRAY et al., 2010).

OS ECPs são representados de modo geral por sete espécies: *Staphylococcus aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. lutrae*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius*, sendo os três últimos pertencentes ao grupo do *S. intermedius* (SIG) (TAPONEN et al., 2012; SASAKI et al., 2010). Durante anos essas espécies foram identificadas fenotipicamente apenas como *S. intermedius*, porém com avanço da biologia molecular, novas técnicas permitiram distingui-las das demais, o que levou a criação do grupo SIG (DEVRIESE et al., 2008).

Os ECNs são frequentemente encontrados na pele e mucosa de humanos e animais sendo patógenos oportunistas e presentes em infecções nosocomiais, associadas a pacientes

imunocomprometidos ou com implantes de dispositivos médicos (OTTO, 2012; ROGERS et al., 2009).

2.2.8 Importância do *Staphylococcus* spp. na sanidade avícola

As doenças infecciosas são as principais responsáveis por perdas econômicas em criações de aves. Em particular, os estafilococos coagulase-positivos (ECP) atuam como agente etiológico em algumas patologias, especialmente *S. aureus* (CORRAND et al., 2012). No entanto, existem relatos de estafilococos coagulase negativo (ECN) sendo responsáveis por causar doenças em aves. As lesões mais associadas à infecção por *Staphylococcus* spp. em aves são artrites, sinovites, condronecrose e osteomielite, dermatite gangrenosa, pododermite, onfalite, septicemia, blefarite e osteomielite mandibular (HUYNH et al., 2014). Tais lesões são responsáveis por causar condenações parciais ou totais, dependendo da extensão da lesão, em abatedouros frigoríficos, pois constam tanto no regulamento de inspeção industrial de produtos de origem animal quanto na portaria 210 (BRASIL, 2017; BRASIL, 1998). Em 2016, Stępień-Pyśniak e colaboradores, relataram a ocorrência de endocardite com lesões de válvulas atrioventriculares esquerda, focos necróticos de tamanho variável no fígado e aumento na mortalidade provocadas por infecção ocasionada por *Staphylococcus simulans* nesses animais.

Fatores como cama com elevada umidade, superlotação, pequeno espaço de tempo entre a retirada e alojamento de lotes, condições precárias de higiene e equipamentos contaminados colaboram com a manutenção do agente no ambiente, sendo dessa forma fatores de risco para o aparecimento de dermatite gangrenosa e celulite nos lotes (UZAL et al., 2017). A análise filogenética de *S. aureus* oriundos de aves indica que todos os isolados estão intimamente relacionados entre si, não existindo separação entre patogênicos e não patogênicos, sugerindo que infecções em aves são causadas por cepas comensais (LOWDER et al., 2009). Sendo, a severidade da doença relacionada à linhagem genética da ave e presença de doenças imunossupressoras nos lotes (BOZORGMEHRI et al., 2007).

2.2.9 Importância do *Staphylococcus* spp. na saúde pública

Além de estar relacionado a perdas econômicas devido ao aumento da mortalidade em criações de aves, os *Staphylococcus aureus* é o patógeno mais presente em toxinfecção alimentar no homem (AYDIN et al., 2011). Foi estimado por Pires e colaboradores em 2012 que os produtos cárneos de origem avícola estão entre as principais fontes de infecção por esse microrganismo tornando-se de grande importância na segurança alimentar (AKBAR et al., 2013).

Os estafilococos coagulase-negativos (ECN) pertencem ao grupo dos patógenos oportunistas que causam infecções em animais e humanos, sendo neste último caso associados a endocardite, septicemia e infecções sanguíneas (BECKER et al., 2014). *Staphylococcus gallinarum* pertence ao grupo dos ECNs e tem sido constantemente isolado da saliva de humanos saudáveis, porém o primeiro relato de ocorrência de infecção no homem foi descrito em paciente portador de hepatite B crônica que possuía contato frequente com aves (YU et al., 2008; OHARA et al., 2008). Existem vários outros relatos de infecções em humanos causadas por este microrganismo como; em lesão de endoftalmite traumática, septicemia em paciente portador de osteosarcoma metastático e em pacientes portadores do vírus da hepatite C (OTERO et al., 2012; TIBRA et al., 2010). Além dos ECNs terem a capacidade de causar doenças, os mesmos podem ser reservatórios e ajudarem na dispersão de genes de resistência a antimicrobianos (SCHOENFELDER et al., 2016).

2.2.10 *Staphylococcus* spp. resistentes aos antimicrobianos da classe β -lactâmicos e vancomicina

Staphylococcus spp. resistentes à meticilina são importantes tanto na medicina humana quanto na veterinária, pois apresentam resistência a todos os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (COHN et al., 2010). O gene mais importante que codifica a resistência é o *mecA*, que fica localizado em um elemento genético móvel chamado de cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*). Existem diferentes tipos de SCC*mec*, e estes podem ser transferidos via plasmídeo, transposons ou elementos genéticos móveis, e se integrar a ilhas de patogenicidade no genoma bacteriano (ITO & KATAYAMA, 2001). Os cassetes *mec* podem carrear outros elementos genéticos, como *Tn554*, pUB110 e pT181, que codificam resistência às outras classes de antimicrobianos. Por exemplo, os genes *erm*, que são os responsáveis pela resistência cruzada, expressa de maneira constitutiva ou induzida, a macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLS_B), estão localizados no *Tn554*, presente no SCC*mec* tipos II e III (ROBERTS, 2008; ITO et al., 2001).

O gene *mecA* codifica a produção de proteína ligante de penicilina de baixa afinidade chamada de PBP2a ou PBP2', essa mudança impede a ligação da penicilina, mantendo dessa forma, a produção de parede celular normal (KURODA et al., 2001).

Na espécie *S. aureus* o gene *mecA* está amplamente difundido e também é encontrado em várias espécies de estafilococos coagulase negativos de origem animal e humana (HUBER et al., 2011). Nemeghaire e colaboradores (2014) encontraram 12,5% de *Staphylococcus sciuri* meticilina resistente em frangos, enquanto em outro estudo realizado na Bélgica pelo mesmo autor foi encontrado 30%. Tais resultados reforçam a importância do estudo da resistência a meticilina em estafilococos coagulase negativa, pois além de causarem doenças em animais e no homem, os mesmos podem transferir os genes de resistência para o *S. aureus* (HANSEN et al., 2006).

Originalmente os *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA) são patógenos hospitalares, porém em animais de produção, o suíno é considerado o maior reservatório de MRSA de sequência tipo 398 (ST398). Todavia, existem relatos em outras espécies animais como em bovinos e aves (HUIJBERS et al., 2015; PERSOONS et al., 2009; LEONARD et al., 2008). A transmissão do MRSA ao homem não ocorre apenas no contato com animais de produção, podendo ser veiculada também através de carnes contaminadas durante a manipulação no interior dos matadouros, como relatado por Lee e colaboradores em 2003 e 2006 na Coreia, e por Kitai e colaboradores no Japão em 2005. De acordo com Barros e colaboradores (2011), no Brasil, mais precisamente em Pernambuco, aves de aptidão corte e postura tem apresentado espécies de *Staphylococcus* com altas taxas de resistência antimicrobiana sendo encontradas em cinco ou mais antibióticos.

Em estudos anteriores desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Bacteriologia Veterinária a UFRRJ, apesar da elevada resistência fenotípica aos beta-lactâmicos, não era observada correlação entre tal resistência e a detecção do gene *mecA* em cepas oriundas de processos infecciosos em animais domésticos (MENDONÇA et al., 2012; SOARES et al., 2010). A busca por possíveis razões permitiu que Melo e colaboradores (2014) identificassem uma nova variante do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. A partir do sequenciamento e comparação do gene variante com o clássico *mecA*, observaram-se mutações pontuais ao longo do gene, as quais impossibilitavam a detecção genotípica com *primers* anteriormente descritos, o que justificava a ausência de correlação fenogenotípica da resistência aos beta-lactâmicos nas cepas estudadas. A análise da presença de tal variante genética em cepas isoladas de diferentes espécies animais deve ser expandida de modo a subsidiar a real compreensão da resistência mediada por *mecA* em *Staphylococcus* spp. meticilina resistentes. Uma vez que a transferência horizontal do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. e dos elemen-

tos genéticos inseridos no SCCmec, resultou então na disseminação mundial de clones oxacilina e multidroga-resistentes, tornando-se uma dificuldade adicional para o controle de infecções causadas por este agente (ITO et al., 2001).

2.2.11 Fatores de virulência relacionados ao *Staphylococcus* spp.

Espécies de *Staphylococcus* spp. são reconhecidos por produzirem distintos fatores de virulência, o que contribui para o seu estabelecimento e manutenção da infecção. Dentre eles estão os fatores associados a produção de enzimas de degradação, juntamente com proteínas encontradas na superfície que reconhecem moléculas da matriz celular do hospedeiro e promovem a colonização. Após seu estabelecimento no tecido, esses microrganismos secretam uma infinidade de outros fatores para obter nutrientes, invadir, sobreviver e disseminar. Outros fatores incluem enzimas e exotoxinas, tais como: hemolisinas (alfa, beta, delta, e gama), leucocidinas e Dnases (HAVERI et al., 2008; EL-SAYED et al., 2006). Através da perda de integridade da pele provocada por arranhões e exacerbadas agressões entre aves, o *S. aureus* pode invadir o tecido subcutâneo com o auxílio da enzima hialuronidase, e instalar-se na musculatura e produzir toxinas termoestáveis causadoras de toxiinfecção alimentar no homem (UZAL et al., 2017; FERREIRA & FERREIRA, 2003).

2.2.12 *Bordetella* spp.

O gênero *Bordetella* pertence à família *Alcaligenaceae* possuindo nove espécies descritas. *B. bronchiseptica*, *B. holmesii*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. pertussis* and *B. parapertussis* causam infecções respiratórias em humanos, ovelhas e aves (KÖNIG et al., 2011). As espécies de bordetelas estão divididas de duas formas, clássicas; que são *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica* e as não clássicas que são as outras espécies. São bactérias Gram negativas pequenas com aparência cocobacilar, aeróbias, catalase-positivas, oxidase-positivas, não formadoras de esporos e móveis por flagelos peritríquios. Por não utilizarem carboidratos, obtêm energia principalmente da oxidação de aminoácidos e não apresentam qualquer requerimento especial para o crescimento, crescendo bem em ágar MacConkey (QUINN et al., 2005).

2.2.13 Importância da *Bordetella* spp. na sanidade avícola

Em avicultura a *Bordetella* é um gênero importante, principalmente a espécie *Bordetella avium* pois é o agente etiológico da Coriza Infecciosa dos Perus, causando impactos econômicos negativos na indústria. *Bordetella hinzii* frequentemente é encontrado colonizando o trato respiratório de galinhas, porém seu potencial patogênico não havia sido comprovado e acreditava-se que a mesma fosse comensal, até que Register e colaboradores (2009) ao realizar infecções experimentais com diferentes cepas de *B. hinzii* verificaram que algumas cepas são patogênicas para galinhas enquanto a *B. avium* raramente é encontrada como patógeno primário causando doença em galinhas (ODUGBO et al., 2006; JACKWOOD, 1995). Outras espécies, como roedores e coelhos, podem sofrer infecção por *B. hinzii* sendo patogênica em alguns casos (JIYIPONG et al., 2013).

Em artigo publicado por Cobb e colaboradores em 2015 e reproduzido pela World Organization for Animal Health (OIE), a bordetelose entrou na lista das doenças aviárias que oferecem riscos sanitários as criações da Nova Zelândia, mesmo sem estar presente na lista da OIE.

2.2.14 Importância da *Bordetella* spp. na saúde pública

Em humanos, *Bordetella hinzii*, foi relacionado como agente patogênico principalmente em pacientes imunocomprometidos (GADEA et al., 2000; KATTAR et al., 2000). COOKSON et al. (1994) foi o primeiro a descrever bacteremia em paciente portador do vírus da

imunodeficiência adquirida (HIV). Inicialmente o microrganismo foi identificado nas provas bioquímicas como *Bordetella avium* ou *B. avium*-like, porém, através da análise dos perfis de ácidos graxos, e posteriormente, técnica de hibridização do DNA, chegou-se à conclusão que haviam encontrado uma nova espécie, que seria a *B. hinzii*. Em 1996, Funke e colaboradores, isolaram duas cepas com diferentes perfis de resistência aos antimicrobianos de pacientes com fibrose cística. Desde então, existem diversos relatos de casos associando a *B. hinzii* a infecções respiratórias (FABRE et al., 2015; FRY et al., 2007), septicemia (KATTAR et al., 2000) e colangite crônica em pacientes transplantados (ARVAND et al., 2004).

Em relato de caso publicado por Arvand e colaboradores (2004) de paciente com colangite crônica e histórico de transplante de fígado, suspeita-se que *Bordetella hinzii* pode ter colonizado o intestino do paciente após ingestão de carne de aves e ter desenvolvido infecção ascendente dos dutos biliares. Uma vez que o paciente não teve contato com aves ou outros animais.

Durante o abate, todos os tecidos do trato respiratório devem ser retirados ao final da calha de evisceração, antes da carcaça entrar no processo de pré-resfriamento, conforme descrito na Portaria N° 210 de 10 de novembro de 1998 (BRASIL, 1998). Porém, mesmo com todos os cuidados, o Ministério da Agricultura e Silvicultura da Nova Zelândia, estimou que 0.2% das carcaças de aves possuíam resquícios de tecidos respiratórios após o processamento. Além da falha no processamento, médicos veterinários não são capazes de identificar lotes infectados na inspeção *ante-mortem*.

A ausência de biossegurança em granjas de produção avícola possibilita a veiculação da *Bordetella hinzii* para trabalhadores, moradores locais e transeuntes. De acordo com dados do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2014), no município de São José do Vale do Rio Preto (SJVRP-RJ), 19,2% dos óbitos foram relacionados a doenças do trato respiratório. Além disso, sabe-se que o uso de promotores de crescimento, somado ao uso indiscriminado de antimicrobianos na forma terapêutica e profilática em granjas industriais na região aumenta a pressão seletiva sobre cepas patogênicas, elevando o risco de dispersão de genes de resistência a antimicrobianos para o homem.

2.2.15 *Bordetella* spp. resistente aos antimicrobianos da classe β -lactâmicos

Loong et al (2016) ao estudar ratos de laboratório isolou nova espécie de bordetela não clássica com características filogenéticas próximas a *B. hinzii*, onde foi observada resistência aos antimicrobianos: amoxicilina com ácido clavulânico, ampicilina, cefuroxima e ceftaxima. Além disso outros pesquisadores isolaram cepas de *B. hinzii* resistentes ou com resistência intermediária a ampicilina, cefuroxima, cefotriaxona, cefotaxima e ciprofloxacina de amostras clínicas (RUIZ et al., 2013; FRY et al., 2007; FUNKE et al., 1996). Esses resultados demonstram que tanto os isolados não clássicos de *Bordetella* quanto os clássicos apresentam perfil de resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, porém a única espécie que possui gene codificador de produção de β -lactamase (*bla*_{BOR-1}) descrito é a *B. bronchiseptica* (LARTIGUE et al., 2005).

2.2.16 Fatores de virulência relacionados a *Bordetella* spp.

As bordetelas exibem mudança de fase que se relacionam com a virulência e são identificáveis pela aparência colonial. A virulência é mediada por vários fatores, incluindo uma hemaglutinina filamentosa, toxina dermonecrotica, pertactina e fímbrias que permitem a ligação aos cílios do trato respiratório superior. Tais fatores de virulência estão conservados entre as espécies de Bordetelas clássicas (*B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*), porém estão ausentes na *B. hinzii*, sendo necessários estudos mais aprofundados nesse sentido (REGISTER et al., 2015).

A *Bordetella avium* não produz hemaglutina filamentosa, porém produz uma hemaglutinina que aglutina especificamente hemácias e que está relacionada com a patogenicidade em *perus jovers* (QUINN et al., 2005). Diferentes cepas de *B. avium* podem produzir; endotoxinas, citotoxina traqueal, toxina dermonecrótica termoestável e osteotoxina (RUMIŃSKA & KONCICKI, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

As amostras foram coletadas em dois estabelecimentos de aves comerciais de corte localizados na microrregião Serrana, e em uma granja de postura caipira localizada na microrregião de Macaé, no estado do Rio de Janeiro, entre abril de 2015 e março de 2016. Foram realizadas duas visitas nas granjas de frango de corte e uma na granja de postura caipira, sendo coletados em cada visita 15 *swabs* de traqueia e 15 *swabs* de cloaca, totalizando 150 *swabs*. A idade média dos animais foi de trinta e três dias de vida nas granjas de corte e sessenta e duas semanas na granja de postura caipira.

As granjas 1 e 2 correspondem aos estabelecimentos de frango de corte e possuem capacidades de alojamento de 30.000 e 40.000 aves, respectivamente. A granja 3 corresponde a postura caipira e possui capacidade de alojamento de 17.000 aves. Os aspectos sanitários dos lotes, sinais clínicos, utilização de medicamentos e adequação de infraestrutura como; presença de muro ou cerca, tela de uma polegada, proximidade com outros produtores, proximidade da rua e de casas foram observados e registrados. Foram selecionadas aves que não estivessem se alimentando no momento da coleta, evitando dessa forma uma possível contaminação da amostra com ração. As aves foram contidas pelo dorso com as asas fechadas junto ao corpo por integrante da equipe do Laboratório de Bacteriologia Veterinária UFRRJ (LABAC-VET UFRRJ) devidamente treinado, enquanto o responsável pela colheta introduzia o “*swab*” na luz da traqueia e cloaca. Foi utilizado álcool 70% para antisepsia das mãos. Os “*swabs*” foram acondicionados e transportados em meio de Stuart (Absorve®) em temperatura ambiente e remetida imediatamente ao LABAC-VET UFRRJ. Os critérios e metodologia utilizada na coleta de material foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da UFRRJ certificado n° 3664040915 (anexo II).

3.2 Isolamento e Identificação

Para a granja 1 e 2 os isolamentos primários foram realizados em meio seletivo Ágar Mac Conkey (MC -HiMedia®), Eosina Azul de Metileno (EMB- HiMedia®) e Ágar Manitol Vermelho de Fenol (AMVF-HiMedia®), enquanto para a granja 3 foram utilizados apenas MC e EMB. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. No MC as colônias fermentadoras de lactose tornam o meio rosa e aquelas não fermentadoras ficam incolores (KONEMAN et al., 2012; HOGAN & SMITH, 2003) enquanto que no EMB as colônias fermentadoras ficam negras. As colônias de *Staphylococcus* spp, foram obtidas a partir do crescimento em AMVF, onde foram selecionados os isolados que utilizaram o manitol como fonte de carbono. A utilização do manitol pelo microrganismo diminuí o pH do meio, alterando a coloração de laranja para amarelo (KONEMAN et al., 2012).

3.3 Identificação Proteômica Através da Técnica MALDI-TOF MS

Todos os bastonetes Gram negativos obtidos através do isolamento em ágar EMB e MC e cocos Gram positivos provenientes do ágar MVF, foram preparados para identificação proteômica realizada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo Góes (IMPG-UFRJ).

Para tal, as cepas foram cultivadas em Agar BHI a 37 °C por 24 h. Cada cultura bacteriana foi transferida para a microplaca (96 MSP, Bruker - Billerica, EUA). Ao sedimento bacteriano foi adicionada uma solução de lise (ácido fórmico 70%, Sigma-Aldrich) em quantidade suficiente para cobrir o sedimento bacteriano. Em seguida, 1µL de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2,5%, Sigma-Aldrich) foi utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra são gerados em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT

Microflex Bruker, Bruker) equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa FlexControl 3.3 (Bruker). Os espectros são coletados na faixa de massas entre 2.000-20.000 m/s, e posteriormente analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker), com as configurações padronizadas para identificação bacteriana. O programa confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência em um banco de dados. Os resultados obtidos variam em uma escala que vai de zero a três, sendo que quanto maior o valor, mais confiável será a identificação. Neste trabalho, considerou-se como uma identificação aceitável aquelas que apresentaram valores iguais ou superiores a dois.

3.4 Identificação Fenotípica de *Staphylococcus* spp.

Para a identificar os isolados que não obtiveram escore suficiente na técnica de MALDI TOF, foi necessária a execução de provas fenotípicas de identificação do gênero *Staphylococcus*. Para tal, as colônias fermentadoras no AMVF foram submetidas à coloração de Gram para verificação das características morfotintórias e também foram submetidas à prova do hidróxido de potássio (KOH) 3%, prova da catalase, prova da coagulase e resistência à bacitracina com disco de 0,04 UI (SENSIFAR -CEFARR). Os estafilococos são resistentes à bacitracina e crescem até a borda do disco, enquanto que os micrococcos são sensíveis e apresentam halo de, no mínimo 10 mm. Os isolados que apresentaram resultado negativo na prova da coagulase foram submetidos ao teste de resistência à novobiocina (5 µg) (SENSIFAR-CEFARR). Os isolados que apresentaram halos menores que 16 mm foram considerados resistentes à novobiocina, sendo posteriormente submetidos à prova de fermentação dos carboidratos: maltose, sacarose, manitol, manose, trealose, xilose, rafinose, celobiose (KONEMAN et al., 2012).

3.5 Detecção Fenotípica da Resistência aos Antimicrobianos

3.5.1 Preparo do inóculo

Após 18 a 24 horas de incubação a 35°C, as colônias foram ressuspensas em solução salina até se obter uma turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland, o que corresponde a uma concentração de, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Como controle foram utilizadas as cepas padrão *Escherichia coli* ATCC25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CLSI, 2014).

3.5.2 Detecção fenotípica da resistência aos antimicrobianos para enterobacteriaceae e bordetella spp

Os testes de disco difusão foram efetuados segundo a metodologia recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Foi realizado antibiograma de triagem com: amoxicilina (AMO 10µg), amoxicilina com ácido clavulânico (AMC 30µg), cefoxitina (CFO 30µg), ciprofloxacina (CIP 5µg), gentamicina (GEN 10µg), imipenem (IMP 10µg), sulfametoxazol-trimetoprima (SUT 25µg). Os pontos de cortes utilizados para detecção de resistência fenotípica do gênero *Bordetella* spp. foram os mesmos da família *Enterobacteriaceae* como descrito por Loong et al. (2016).

3.5.3 Pesquisa de β-lactamase em Isolados de *E. coli* e *Bordetella* spp.

Os isolados de *Escherichia coli* e *Bordetella* spp. que apresentaram resistência à AMC, AMO ou CFO no teste de disco difusão de triagem foram submetidos à pesquisa para avaliação da produção de β-lactamases. Foi realizado o antibiograma utilizando os seguintes discos de antibióticos: amoxicilina (AMO 10µg), ceftazidima (CAZ 30µg), cefoxitina (CFO 30µg), cefotaxima (CTX 30µg), aztronam (ATM 30µg), imipenem (IMP 10µg), cefepime (CPM 30µg), e amoxicilina + ácido clavulânico (AMC 30µg). Neste teste também foi realizada leitura interpretativa que indicou os suspeitos da produção de ESBL e AmpC. O disco de amoxi-

cilina com ácido clavulânico foi colocado no centro da placa mostrando sinergismo com cefalosporinas de terceira geração quando produtoras de ESBL. Os produtores de AmpC quando induzíveis demonstram antagonismo entre o disco de imipenem e cefepime. As cepas padrão utilizadas foram *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Os discos com antimicrobianos foram organizados conforme figura 1.

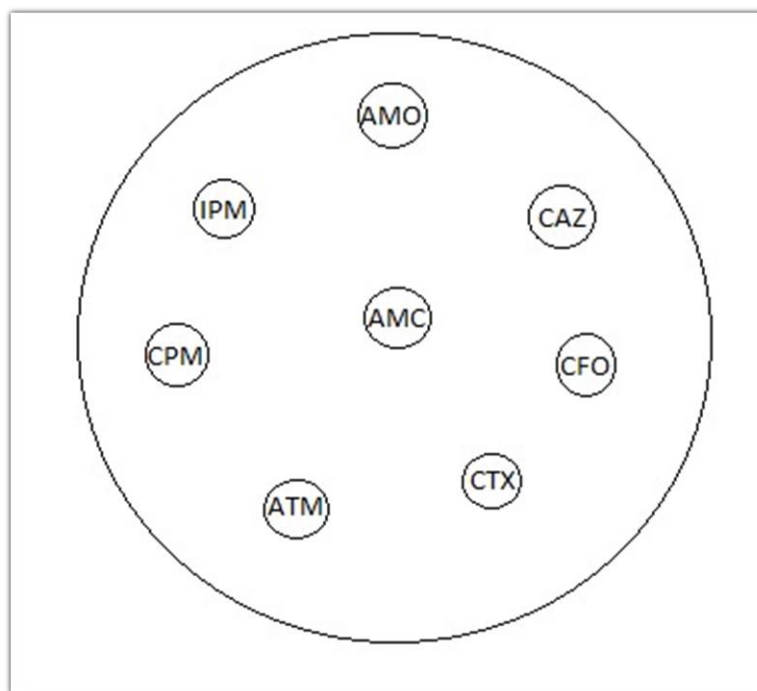


Figura 1 - Esquema da disposição dos antimicrobianos na placa.

3.5.4 Detecção de resistência fenotípica à colistina em *Escherichia coli*

O Ágar Screen com colistina (COL) foi utilizado na detecção de *E. coli* resistentes a este antimicrobiano. O teste foi realizado através da inoculação de isolados de *E. coli* provenientes de suspensões diretas das colônias equivalentes à escala 0,5 de McFarland, o que corresponde a uma concentração de, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, sobre a superfície do Ágar Mueller-Hinton suplementado com, 2 µg/mL, 4 µg/mL e 8 µg/mL de colistina. Estas placas foram incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas e após este período, foi procedido um exame cuidadoso para verificar a presença de pequenas colônias ou crescimento em filme, o valor de corte utilizado foi de ≥ 2 µg/mL (PIRS et al., 2017; NORDMANN et al., 2016). Como controle positivo foi utilizada a cepa padrão *E. coli* ATCC 25922.

3.5.5 Teste de disco difusão para *Staphylococcus* spp.

Os testes de difusão em disco foram efetuados segundo a metodologia recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014). Os antimicrobianos testados foram: penicilina (PEN 10 µg), cefoxitina (CFO 30 µg), oxacilina (OXA1µg), vancomicina (VAN 30µg).

3.5.6 Detecção da resistência à vancomicina por ágar screen em cepas de *Enterococcus* spp.

O Ágar Screen com vancomicina foi utilizado na detecção de *Enterococcus* spp. resistentes ou com reduzida suscetibilidade a este antimicrobiano. O teste foi realizado, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2017), através da inoculação de isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de suspensões diretas das colônias equivalentes à escala

0,5 de McFarland, o que corresponde a uma concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, sobre a superfície do Ágar Infusão de Cérebro e Coração suplementado com 6 µg/mL de vancomicina. Estas placas foram incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas e após este período, foi procedido um exame cuidadoso para verificar a presença de pequenas colônias ou crescimento em filme. Foram utilizadas duas cepas padrão, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 que é resistente à vancomicina e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 que é sensível.

3.6 Detecção Genotípica dos Isolados Avaliados

3.6.1 Extração do DNA pela técnica de lise térmica para cepas de *E. coli*

A extração do DNA foi realizada pelo método de lise térmica segundo BUYUKCAN-GAZ e colaboradores (2013) com modificações estabelecidas pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LABAC-VET). Cada isolado foi cultivado em 1,5 mL de caldo Brain Heart Infusion (Kasvi®) a 35°C por 24 horas. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados por 2 minutos a 13.500 rpm e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspendidas em 200 µL de água ultrapura e agitada em vórtex, sendo então incubadas a 100°C por 10 minutos. Após o tempo estipulado, os microbutos foram esfriados em temperatura ambiente e centrifugados por 2 minutos a 13.500 rpm. Aproximadamente 180 µL do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos de (600 µL). Depois disso, os microtubos foram armazenados a temperatura de -20°C .

3.6.2 Ampliação do gene 16S rDNA através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Após a extração rápida do DNA genômico bacteriano, a identificação das cepas isoladas foi confirmada através da amplificação da região 16S do rDNA (27f e 1512r) de bactérias gerando um fragmento de 1500 pb pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Para o preparo do mix de reação foi utilizado 2 µL de Buffer 10X (10 mM Tris-HCl (pH 9,0) (Invitrogen), 2,0 µM de 20 mM de MgCl_2 (Invitrogen), 0,2 mM de trifosfato de desoxinucleótido (Invitrogen), 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas), 1 mM de cada *primer* para um volume total de 20 µl de reação contendo 20 ng do DNA extraído. Os iniciadores utilizados estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 - Descrição do primer degenerado utilizado para amplificação da região 16S rDNA bacteriano para as estirpes de Enterobactérias

| Gene alvo | Sequência (5'-3') | Referência |
|-----------|----------------------|---------------------------|
| 27F | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | SUZUKI & GIOVANNONI, 1996 |
| 1512R | ACGGCTACCTTGTTACGACT | KANE et al., 1993 |

Ciclo: 94°C 5min (94°C 1min; 65°C 1min; 72°C 1min) x30, 72°C 5min.

3.6.3 Detecção de genes relacionados a resistência antimicrobiana em *E. coli*

Todas as cepas de *E. coli* foram submetidos a pesquisa de genes associados a resistência; produção de b-lactamase (*bla_{TEM}*), tetraciclina (*TetA*, *TetB*), sulfonamidas (*Sul1*), trimetropina (*Dfr17*), quaternário de amônio (*Qac Delta1*), gentamicina (*aac3* e *aph3*), colistina (*mcr-1*), prata (*silP*), proteína D de resistência ao cobre (*pcoD*), aminoglicosídeo (*aadA*). Para o preparo do mix de reação foi utilizado 2 µL de Buffer 10X (10 mM Tris-HCl (pH 9,0) (Invitrogen), 2,0 µM de 20 mM de MgCl_2 (Invitrogen), 0,2 mM de trifosfato de desoxinucleotídeos (Invitrogen), 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas), 1 mM de cada *primer* para um volume total de 20 µl de reação contendo 20 ng do DNA extraído. Os iniciadores usados são descritos no quadro 2.

Quadro 2 - Descrição dos primers utilizados para detecção dos genes de resistência a antimicrobianos em *E. coli*

| Genes alvos | Sequência (5'3') | Frag (pb) | Referência* |
|--------------------------|---|-----------|-----------------------------------|
| <i>bla_{TEM}</i> | ATGAGTATTCAACATTTCCGTG TTACCAATGCTTAATCAGTGAG | 860 | SPANU et al., 2002 ¹ |
| <i>TetA</i> | CGGGGCGACTGGGGCGGTAGC CAAAGCGCGGCCCGGCACCTGTC | 372 | JOHNSON et al., 2012 ² |
| <i>TetB</i> | GCTTTCAGGGATCACAGGAG GACCAAGACCCGCTAATGAA | 458 | LI et al., 2007 ³ |
| <i>sul1</i> | CGGCGTGGGCTACCTGAACG GCCGATCGCGTGAAGTTCCG | 405 | KERRN et al. 2002 ¹ |
| <i>dfr17</i> | TCTTTAAAGCGCTCACATATAATCAGTG ATTTGACCGCCACCAGAGACA | 214 | JOHNSON et al., 2007 ² |
| <i>Qac Delta1</i> | GCCCCTCCGCGTTGTCATAATC CGGCCTCCGCAGCGACTTCC | 250 | JOHNSON et al., 2012 ² |
| <i>aac3-VIa</i> | GGCACCCGCGACGCCCTGGTCCAAAAG GGGCCCGGCGCCGATCGACAGGATTT | 502 | JOHNSON et al., 2006 ² |
| <i>aac3-VIb</i> | GGGCAAGCGCCGCGTCACTTATT CGCGGCGTTGTTTCGGCTTCA | 302 | JOHNSON et al., 2006 ² |
| <i>aph(3)IA</i> | CGAGCATCAAATGAAACTGC GCGTTGCCAATGATGTTACAG | 624 | AGGEN et al., 2010 ⁵ |
| <i>mcr-1</i> | CGGTCAGTCCGTTTGTTC CTTGGTCGGTCTGTA GGG | 1626 | LIU et al., 2015 ⁴ |
| <i>silP</i> | ACACCCCGGCCTGGGCTCCTT TGCGGGCACGGGAACAAACCTC | 603 | JOHNSON et al., 2007 ² |
| <i>pcoD</i> | GGCGCCAGAAATGATAATCGCAACA GGGCGTGGCGCTGGCTACACTT | 502 | JOHNSON et al., 2007 ² |
| <i>aadA</i> | TAACGGCGCAGTGGCGGTTTTCA AAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAG | 365 | JOHNSON et al., 2007 ² |

Ciclo: 1. (94°C 30 s; 42°C 1 min; 72°C 1 min) x 35, 72°C 10 min. 2. (95°C, 30 s 55°C, 30 s 72°C, 15 s) x 30, 72°C por 5min. 3. (98°C, 5 s 55°C, 15 s 72°C, 60 s) x 35, 72°C 10min. 4. 94°C 15 min (94°C 30 s; 58°C 90 s; 72°C 60 s) x 25, 72°C por 10 min. 5. 94°C 5min (94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min) x 30, 72°C 10 min.

3.6.4 Detecção de genes de virulência para formação de perfis em *E. coli*

Foi utilizada a técnica de PCR multiplex para identificação presuntiva das cepas APECs buscando os genes; receptor de siderofilo Samochelin (*iroN*), codificador de protease de membrana externa epissomal (*dompT*), codificador de hemolisina putativa de *E. coli* aviária (*hlyF*), de sobrevivência ao soro (*iss*), receptor de siderofilo aerobactina (*iutA*). Para o preparo do mix de reação foi utilizado 2 µL de Buffer 10X (10 mM Tris-HCl (pH 9,0) (Invitrogen), 2,0 µM de 20 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,2 mM de trifosfato de desoxinucleótido (Invitrogen), 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas), 1 mM de cada *primer* para um volume

total de 20 µl de reação contendo 20 ng do DNA extraído, os primers utilizados encontram-se no quadro 3.

Quadro 3 - Descrição das sequências de primers para amplificação de genes de virulência utiliza-dos para formação de perfis genéticos em cepas de *E. coli*

| Genes alvos | Sequência (5'3') | Fragmento (pb) | Referência* |
|--------------|--|----------------|-----------------------------------|
| <i>iroN</i> | AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT | 553 | JOHNSON et al., 2006 ⁴ |
| <i>dompT</i> | TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC | 496 | JOHNSON et al., 2006 ⁴ |
| <i>hlyF</i> | GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG | 450 | MORALES et al., 2004 ⁴ |
| <i>Iss</i> | CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA | 323 | JOHNSON et al., 2008 ⁴ |
| <i>iutA</i> | GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG | 302 | JOHNSON et al., 2000 ⁴ |

Ciclo: 1. 94°C 5 min (94°C 30 s, 50°C 30 s) x 30, 72°C 30 s. 2. 50°C 2 min, 95°C 5 min (95°C 45 s, 50°C s, 72°C 45 s) x 40, 72° 10 min. 3. (95°C 30 s, 72°C 1 min) x 5, (95°C 30 s, 63°C 30 s, 72°C 30 s) x 20, 72°C 5 min. 4. 94°C 2 min, (94°C 30s, 63°C 30s, 68°C 3min) x 25, 72°C 10 min.

3.6.5 Classificação das cepas de *E. coli* em grupos filogenéticos

Em conjunto foi realizada a identificação dos grupos filogenéticos usando a técnica de PCR, onde os isolados foram classificados nos seguintes grupos: A, B1, B2, C, D, E, F. Os primers utilizados encontram-se descritos no quadro 4.

Quadro 4 - Primers utilizados na tipagem filogenética das cepas de *E. coli*

| Genes | Sequência (5'3') | Fragmento (pb) | Referência* |
|---------------------------------|--|----------------|--|
| <i>chuA</i> | ATGGTACCGGACGAACCAAC TGCCGCCAGTACCAAAGACA | 288 | CLERMONT et al., 2013 ¹ |
| <i>yjaA</i> | CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG AATGCGTTCCTCAACCTGTG | 211 | CLERMONT et al., 2013 ¹ |
| <i>TspE4C2</i> | CACTATTCGTAAGGTCATCC AGTTTATCGCTGCGGGTCGC | 152 | CLERMONT et al., 2013 ¹ |
| <i>AceK F</i> <i>ArpA1 R</i> | AACGCTATTCGCCAGCTTGC TCTCCCCATACCGTACGCTA | 400 | CLERMONT et al., 2013 ¹ CLERMONT et al., 2004 ¹ |
| <i>ArpAgpE</i> | GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC GAAAAGAAAAAGAATTTCCAAGAG | 301 | LESCAT et al., 2013 ² |
| <i>trpAgpC</i> | AGTTTTATGCCAGTGCGAG TCTGCGCCGGTACGCCCC | 219 | LESCAT et al., 2013 ³ |
| <i>trpBA</i> | CGGCGATAAAGACATCTTAC GCAACGCGGCCTGGCGGAAG | 489 | CLERMONT et al., 2008 |

Ciclo: 1.94°C 4 min (94°C 5 s, 63°C 30 s, 72°C 30 s) x 30, 72°C 5 min quadruplex 2. 94°C 4 min (94°C 5 s, 64°C 30 s, 72°C 30 s) x 30, 72°C 5 min (grupo E) 3.94°C 4 min (94°C 5 s, 66°C 30 s, 72°C 30 s) x 30, 72°C 5 min (grupo C).

3.6.6 Análise da diversidade por PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

Cada cepa bacteriana foi inoculada em ágar Caseína Trypticase de Soja (TCS) e incubadas a 37°C por 16-18 horas. Células foram removidas da placa, inseridas em tubos contendo 2 mL de buffer de suspensão celular (CSB) (100 mM Tris-HCl 100 mM EDTA pH 8) para serem analisadas por espectrofotômetro e ajustadas a 610 nm (DO<1) que corresponde a 1 na escala de Mc Farland. A suspensão de células padronizada (245 µL) foi transferida para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e a proteinase K (solução-estoque de 20 mg/mL) foi adicionada a uma concentração final de 1 mg/mL cada e homogeneizadas por pipetagem. Um volume igual de 2% de Agarose de Baixo ponto de Fusão (BRL®) fundido preparado em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) e mantido a 50°C foi adicionado à suspensão celular e misturado pipetando suavemente para cima e para baixo várias vezes. A mistura foi transferida para dois moldes reutilizáveis Molde Bio-Rad, Hercules, CA e mantidos a 4°C durante 20 minutos. Os blocos de agarose foram transferidos para tubos cónicos de 2 mL contendo 1275 µL de tampão de lise I (50 mM de Tris, 50 mM de EDTA, pH 8,0 e 1% de lauril sarcosina de sódio) e 75 µL de proteinase K (solução-estoque 20 mg/ml) incubadas a 50°C durante 90 minutos num banho de água. A solução tampão de lise foi removida e os blocos foram lavados duas vezes com água em Banho Maria a 50°C durante 15 minutos. Depois, foram lavados com 10 mL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) durante 4 vezes a 50°C durante 15 minutos em banho maria e depois armazenados em 10mL de tampão TE a 4°C.

3.6.7 Digestão de DNA genômico em blocos de agarose

A digestão enzimática foi feita por adição de um fragmento do bloco de agarose em microtubos contendo tampão de restrição (2 µL de albumina, 20 µL de Tampão 10X, 74 µL de água livre de nuclease e 4 µL de enzima de restrição *Xba*I). A restrição com *Xba*I (Promega®) foi feita a uma concentração de enzima de 10U por tampão durante um tempo de corte de 1 h e 30 minutos a 37 ° C.

3.6.8 Eletroforese e coloração do gel de agarose

A técnica PFGE foi realizada com o sistema CHEF DR-III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os fragmentos de restrição de DNA em blocos foram separados por eletroforese através de gel de Agarose SeaKem a 1% (SIGMA Chemical Company, EUA) em solução 0,5 X de tampão Tris-borato-EDTA (preparado por diluição de 10X TBE). Os parâmetros eletroforéticos utilizados foram os seguintes: tempo de comutação inicial, 2,2s; Tempo de comutação final, 54,2s; Tempo de execução, 19 h; Ângulo, 120°; Gradiente, 6,0V/cm; Temperatura, 14°C. Após eletroforese, os géis foram corados durante 30 minutos em 150 mL de uma solução 0,5X de Tris-borato-EDTA contendo 6 mL de brometo de etídio 10 mg / mL. Um padrão de tamanho molecular (*Salmonella entérica* sorotipo Braenderup H9812) foi utilizado como um marcador proposto pela CDC (*Center of Disease Control and Prevention*) PFGE em cada experimento juntamente com os isolados de *E. coli* a serem testados (ROMERO et al., 2004).

3.6.9 Análise dos perfis eletroforéticos

A similaridade foi analisada de acordo com o protocolo da Pulsenet. Os padrões de macrorestrição com *Xba*I foram observados com o software BioNumerics 6.0 (Applied Maths, A., USA) utilizando o método UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic

Mean”) e o coeficiente de Dice interpretados conforme TENOVER et al., (1995). Na comparação da similaridade entre clusters aplicou-se 1,5% na tolerância de corte.

3.6.10 Detecção de plasmídeos, gene facilitador de transmissão e gene de acumulação de resistência

A pesquisa de plasmídeos foi realizada através da técnica de PCR para identificação de genes marcadores de grupos de incompatibilidade plasmidial, sendo possível detectar os seguintes genes; *Incl2*, *P*, *A/C*, *FIC*, *B/O*, *Y*, *FIB*, *FIA*, *FIIA*, *W*, *K/B*, *L/M*, *HI2*, *N*, *X*, *II*. Para avaliar a capacidade de acumulação e transmissão dos genes de resistência frente aos antimicrobianos foi investigada a presença dos genes *intI1* e *ISEc12*, os quais codificam a produção de integrase e transposase, respectivamente. As sequências utilizadas encontram-se descritas no quadro 5.

Quadro 5 - Primers utilizados na detecção de plasmídeos, gene facilitador de transmissão e gene de acumulação de resistência em cepas de *E. coli*

| Plasmídeo | Sequência (5'3') | Fragmento (pb) | Referência* |
|---------------|---|----------------|--|
| <i>intI1</i> | CCTCCCGCACGATGATC TCCACGCATCGTCAGGC | 279 | BASS et al., 1999 LEVESQUE et al., 1993 |
| <i>ISEc12</i> | CGCGGCCACGTAAACCGAAAGATAAA GCGCGGGTGCACAGCAACCTC | 404 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>Incl2</i> | TTACAGTGCAAGCTAAGTGCAG GATTCACGGTCCCATATCGT | 615 | WONG et al., 2015 |
| <i>P</i> | CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA TCACGCGCCAGGGCGCAGCC | 534 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>A/C</i> | GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT | 465 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>FIC</i> | GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT | 262 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>B/O</i> | GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC TCTGCGTTCGCCAAGTTCGA | 159 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>Y</i> | AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT | 765 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>FIB</i> | GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT | 702 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>FIA</i> | CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG | 462 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>FIIA</i> | CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG | 270 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>W</i> | CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG GGTGCGCGGCATAGAACCGT | 242 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>K/B</i> | GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC TCTTTCACGAGCCCGCCAAA | 160 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>L/M</i> | GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG | 785 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>HI2</i> | TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC GGTCACTACCGTTGTCATCCT | 644 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>N</i> | GTCTAACGAGCTTACCGAAG GTTTCAACTCTGCCAAGTTC | 559 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>X</i> | AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTTAGC | 376 | JOHNSON et al., 2007 |
| <i>II</i> | CGAAAGCCGGACGGCAGAA TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT | 139 | JOHNSON et al., 2007 |

3.6.11 Extração do DNA total para cepas de *Staphylococcus* spp.

Para a extração do DNA bacteriano, foi realizada metodologia estabelecida pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ (LABAC-VET). Cada isolado foi cultivado em 5 mL de Caldo BHI à temperatura ambiente por 12-16 horas a 150 rpm. Em seguida 1,5mL da cultura foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugado por 5 minutos a 12.000 RPM e o sobrenadante foi descartado, esta etapa foi repetida três vezes. As células foram resuspendidas em 600 µL de solução de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8,0; EDTA 25 mM pH 8,0; SDS 1%, NaCl 25 mM) e agitadas em Vortex, sendo incubadas a 65°C por 30 min. Após o tempo estipulado, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e foi adicionado 600 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguido de uma homogeneização por 2 min, adição de igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugação a 13.000 RPM por 10 min. A fase superior foi transferida para um novo microtubo (aproximadamente 400 µL) e foi adicionado 2 volumes de etanol 100 % gelado, seguido de incubação a 20 °C por 2 ou 12 h para a precipitação do DNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 13.000 RPM por 30 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 70 % (aproximadamente 500 µL). Depois de seco a temperatura ambiente em uma capela de exaustão, os sedimentos foram então ressuspensos em 30 µL de tampão TE (Tris-HCL 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM pH 8,0).

Para quantificação, os DNAs extraídos foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose (0,8%) que foi revelado com Sybr Green (Invitrogen) pelo fotodocumentador L-PIX EX (Loccus Biotecnologia). A estimativa da concentração de DNA foi feita por comparação com o padrão de intensidade de banda do marcador Lambda (λ) (Promega), nas concentrações de 25 e 50 ng e a qualidade determinada pela ausência de rastro ao longo do gel.

3.6.12 Caracterização genotípica de *Staphylococcus* spp. através da técnica de PCR

Os isolados foram caracterizados genotipicamente através da técnica de PCR para caracterização de gênero de *Staph* (*Staphylococcus* spp.) (ZHANG et al., 2004). O *primer* utilizado para este grupo de bactérias está apresentado no quadro 06.

Quadro 6 - Iniciadores e referências dos ciclos empregados na amplificação dos genes 16S rRNA de *Staphylococcus* spp.

| Gene | Espécie | Primer (5' - 3') | Ciclo* |
|----------------------|----------------------------|--|-----------------------|
| 16S rRNA (756 pb) | <i>Staphylococcus</i> spp. | AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC | ZHANG et al., 2004 |

Ciclo: 94°C 5min. (94°C 1min, 55°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 10min.

3.6.13 Detecção de genes de resistência a oxacilina em *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a técnica de PCR para detecção do gene *mecA* utilizando iniciadores desenhados por Murakami e colaboradores (1991) e também os desenhados por MELO e colaboradores (2013), *mec* “Universal” e *mec SsciuriInt* (Quadro 7). Foi utilizada como controle positivo para o gene *mecA* a cepa de *S. aureus* ATCC 43300 (CLSI, 2014).

Quadro 7 - Iniciadores e condições de amplificação para a detecção dos genes de resistência me-cA.

| Gene | Iniciadores (fragm.) | Sequência dos iniciadores (5'-3') | Referências |
|-------------------------|------------------------------------|---|----------------------------------|
| <i>mecA</i> | <i>mec</i> "Universal" (574 pb) | ACG TTA CAA GAT ATG AAG ACA TTA ATA GCC ATC ATC | MELO et al. 2014 ¹ |
| <i>mecA</i> Variante | <i>mec SsciuriInt</i> (809pb) | CAG GCA TGC AGA AAA ATC AA TTG AGT CGA ACC AGG TGATG | MELO et al., 2013 ² |
| <i>mecA</i> | <i>mecA</i> (533 pb) | AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C AGT TCT GCA GTA CCGGAT TTG C | MURAKAMI et al.1991 ³ |

1. 95 °C 5 min (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min. 2. (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min; 3. 94 °C 4 min (94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 4 min.

3.6.14 Detecção do gene relacionado à produção de β -lactamases

Foi realizada a técnica de PCR para detecção do gene *blaZ*, que codifica a produção de beta-lactamases em *Staphylococcus* spp. (ROSATO et al., 2003) (Quadro 8). Foi utilizado como controle positivo a cepa de *S. aureus* ATCC 43300.

Quadro 8 - Iniciadores e condições de amplificação para a detecção do gene blaZ.

| Gene (tam. do fragemento) | Sequência dos iniciadores (5'-3') | Ciclo |
|---------------------------|--|--|
| <i>blaZ</i> (861 pb) | TAC AAC TGT AAT ATC GGA GG CAT TAC ACT CTT GGC GGT TT | 94°C 5min. (94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s) x 35, 72°C 5min. |

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Situação Epidemiológica, Sanitária e Infraestrutura das Granjas Visitadas

A situação epidemiológica e infraestrutura, assim como o uso de antimicrobianos tanto na forma terapêutica como na forma de aditivo encontram-se descritos no quadro 9. Foi observado que as granjas 1 e 2 possuíam maior risco de dispersão de genes de resistência a antimicrobianos, pois possuíam falhas em diversos aspectos estruturais, como; proximidade da rua e casas, ausência de muros ou cercas, telamento do galpão incompleto ou inadequado. Em ambas as granjas, também foram observadas durante as visitas a presença de aves selvagens dentro do galpão tal fator pode facilitar na dispersão de agentes.

Quadro 9 - Informações gerais das granjas estudadas.

| | Granja 1 | Granja 2 | Granja 3 |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Tipo de criação | FR | FR | PC |
| Cerca | incompleta | não | sim |
| Tela 1 polegada | incompleta | sim | sim |
| Distância rua | menos 5 m | 300 m | 100 m |
| Distância casas | menos 5 m | 120 m | 40 m |
| Vizinhos | menos 5 m | 120 m | não possui |
| Tratamento cama | não | não | sim |
| Destino cama | lavoura | lavoura | lavoura |
| Controle de veículos | não | não | sim |
| Controle de pessoas | não | não | sim |
| Problemas recria | CL 2° coleta | MIT, COND | MS, DM, BI |
| Antibiótico terapia | OTC | Não utilizou | OTC, ENRO |
| Antibiótico aditivo | ENRA | ENRA | COL |

Legenda: FR- frango de corte, PC- postura caipira, CL- colibacilose, MIT-micotoxicose, COND- Condrodistrofia, MS- *Mycoplasma sinoviae*, DM- Doença de Marek, BI- Bronquite Infecciosa das Galinhas, OTC- Oxitetraciclina, ENRO- Enrofloxacina, COL- Colistina, ENRA- Enramicina.

4.2 Identificação e Suscetibilidade Antimicrobiana de Enterobactérias e *Bordetella* Spp. Provenientes de Amostras Aviárias

Após coleta de 120 amostras, sendo 60 de cloaca e 60 de traqueia, em duas granjas de frango de corte (1 e 2) localizadas na microrregião serrana e 30 amostras da granja de galinha caipira de postura (3) localizada na microrregião de Macaé do estado do Rio de Janeiro, foram isoladas 163 cepas bacterianas oriundas da granja 1 e 2, sendo 49% (80/163) proveniente da granja 1 e 51% (83/163) da granja 2, na granja 3 foram analisados apenas doze isolados fermentadores de lactose, que foram identificados posteriormente como *E. coli*. A identificação dos isolados foi realizada pela técnica de MALDI TOF MS, com boa pontuação (2.0 a 2.495). Em relação ao perfil de distribuição por sítio de coleta, observou-se que na granja 1, um total de 40% (32/80) dos isolados eram provenientes de cloaca, enquanto 60% (48/80), de traqueia. Após análise das espécies, foi possível determinar prevalência da espécie *Escherichia coli* em 59% (47/80), sendo identificadas também as espécies *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Bordetella hinzii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter iwoffii*, *Leclercia adecarboxylata*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Actinobacter junii* cujas distribuições percentuais, considerando os dois sítios de coleta, se encontram na figura 2.

Na granja 2, 44% (37/83) dos isolados eram provenientes da cloaca enquanto 55% (46/83) da traqueia. *Escherichia coli* também foi prevalente, identificada em 57% (48/83) dos isolados, sendo identificados também as espécies *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*,

Enterococcus avium, *Enterococcus faecalis*, *Bordetella hinzii*, *Enterococcus hirae*, *Bordetella avium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae* (figura 2).

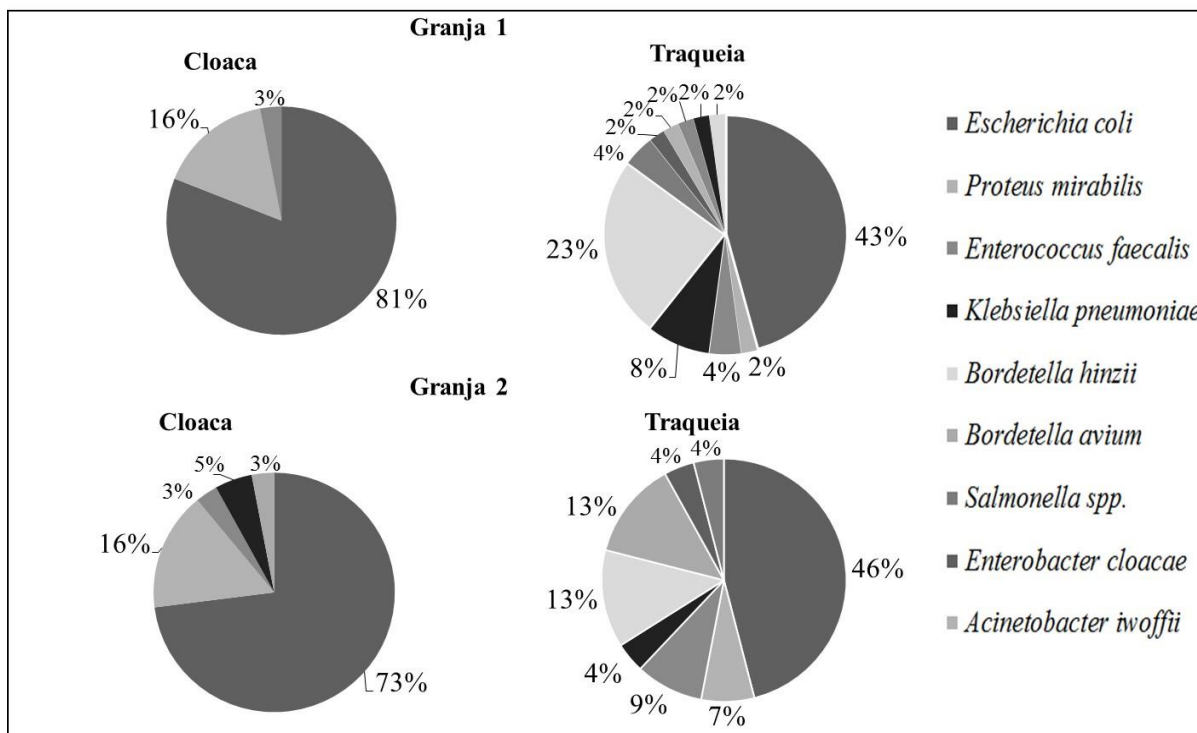


Figura 2 - Prevalência bacteriana de acordo com a origem da amostra

4.3 Panorama Geral da Resistência Fenotípica

Considerando os resultados obtidos a partir da técnica de disco difusão, os percentuais de resistência detectados em bactérias isoladas de cloaca e de traqueia nas granjas 1 e 2 estão expostos na figura 3 e 4, 5 e 6 respectivamente.

Devido à maior prevalência de *Escherichia coli* em ambas as propriedades avícolas, foram realizadas análises fenotípicas e genotípicas de resistência e genotípicas de virulência direcionadas exclusivamente à esta espécie. Tais percentuais de resistência fenotípica encontram-se na figura 7.

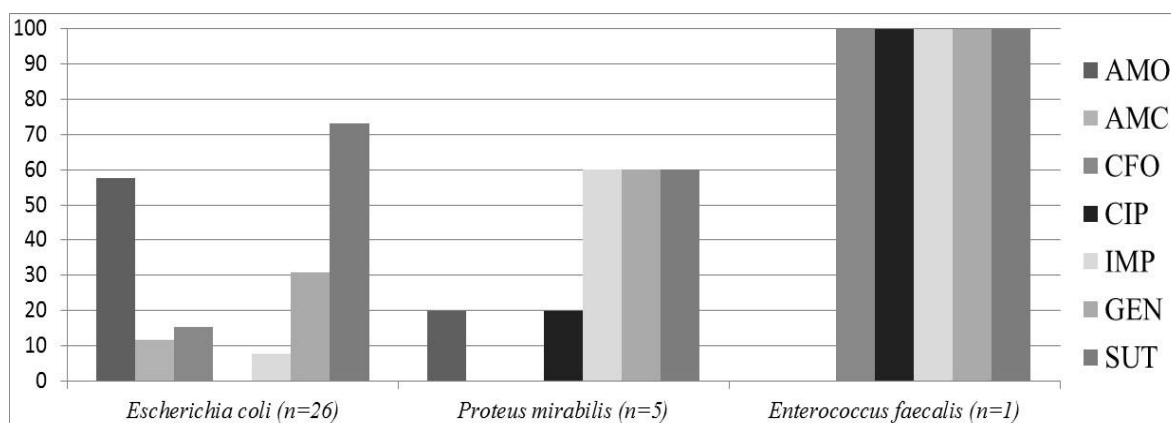


Figura 3 - Gráfico apresentando percentual de resistência das espécies de enterobactérias e *Bordetella* spp. isoladas de cloaca, na granja 1. Legenda: AMO- Amoxicilina, AMC- Amoxici-lina com ácido clavulâmico, CFO- Cefoxitina, CIP- Ciprofloxacina, IMP- - Imipenem, GEN- Gentamicina, SUT- Sulfa-trimetoprima.

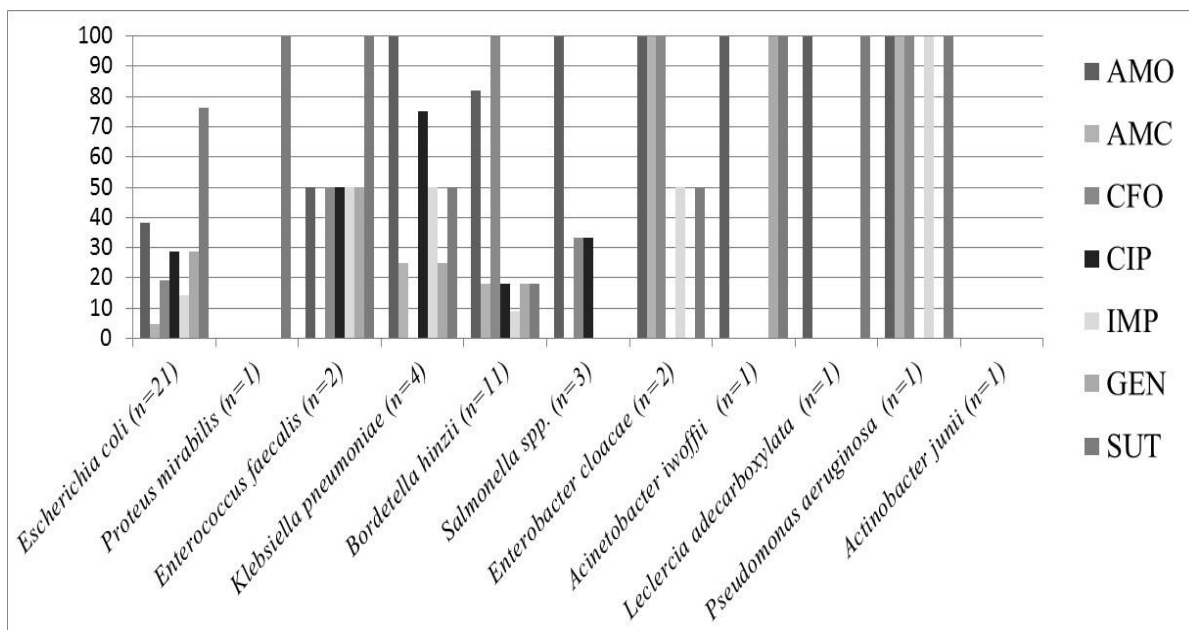


Figura 5 - Gráfico apresentando percentual de resistência das espécies de enterobactérias e *Bordetella* spp. isoladas de traqueia, na granja 1. Legenda: AMO- Amoxicilina, AMC- Amoxicilina com ácido clavulâmico, CFO- Cefoxitina, CIP- Ciprofloxacina, IMP- Imipenem, GEN- Gentamicina, SUT- Sulfa-trimetoprima.

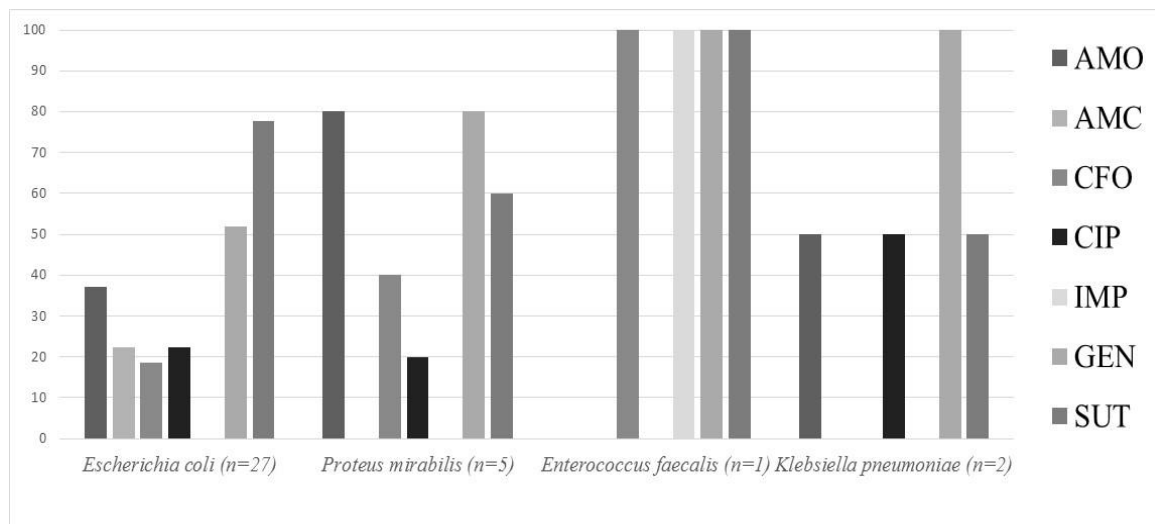


Figura 4 - Gráficos apresentando percentual de resistência das espécies de enterobactérias e *Bordetella* spp. isoladas de cloaca e de traqueia, na granja 2. Legenda: AMO- Amoxicilina, AMC- Amoxicilina com ácido clavulâmico, CFO- Cefoxitina, CIP- Ciprofloxacina, IMP- Imipenem, GEN- Gentamicina, SUT- Sulfa-trimetoprima.

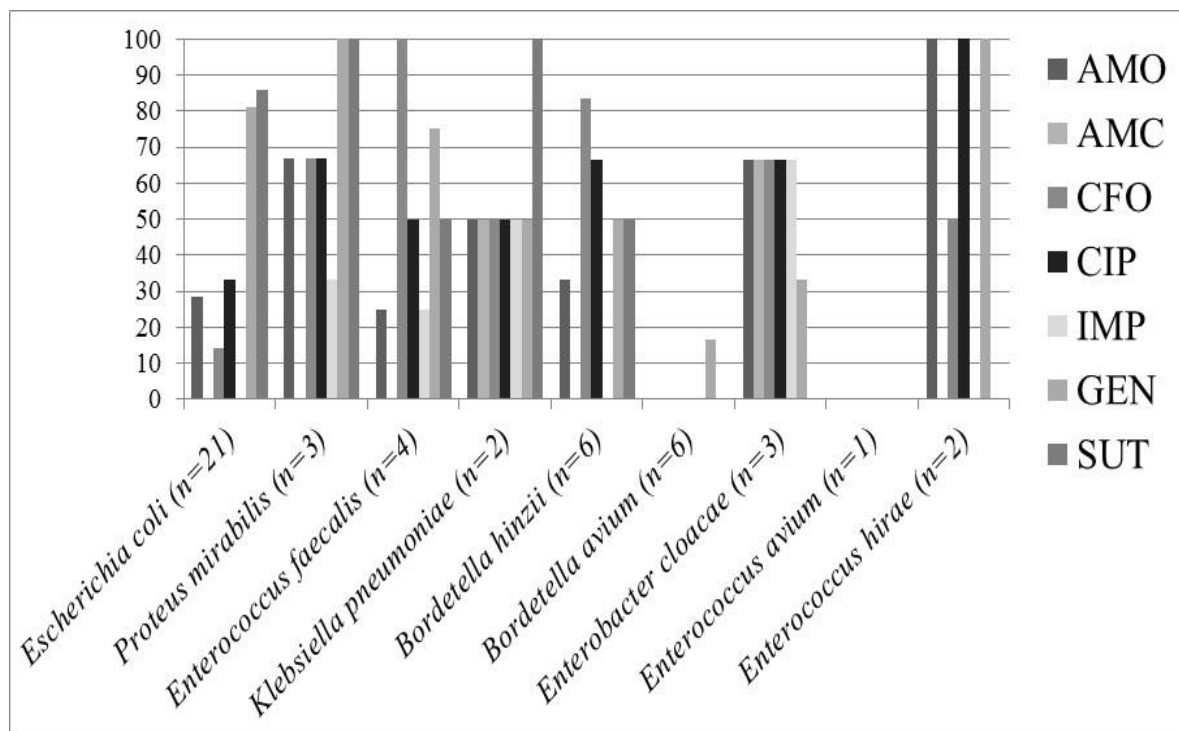


Figura 6 - Gráficos apresentando percentual de resistência das espécies de enterobactérias e *Bordetella* spp. isoladas de traqueia, na granja 2. Legenda: AMO- Amoxicilina, AMC- Amoxicilina com ácido clavulâmico, CFO- Cefoxitina, CIP- Ciprofloxacina, IMP- Imipenem, GEN- Gentamicina, SUT- Sulfa-trimetoprima.

Na granja 1 100% (26/26) das cepas de *E. coli* de cloaca apresentaram resistência a COL, 73% (19/26) a SUT, 57% (15/26) ao CIP, 57% (15/26) a AMO, 30% (8/26) a GEN, 15% (4/26) a CFO, 11% (3/26) a AMC e 7% (2/26) ao IMP. As cepas de *Proteus mirabilis* apresentaram 60% (3/5) de resistência ao SUT, 60% (3/5) GEN, 60% (3/5) IMP, 20% (1/5) a AMO, 20% (1/5) CIP. A única cepa de *Enterococcus faecalis* apresentou resistência a CIP, IMP, GEN, sendo a resistência apresentada ao CFO e SUT intrínseca.

Das 21 cepas de *E. coli* oriundas de traqueia da granja 1 95% (20/21) apresentaram resistência fenotípica a COL, 76% (16/21) ao SUT, 38% (8/21) a AMO, 28% (6/21) a CIP, 28% (6/21) a GEN, 19% (4/21) a CFO, 14% (3/21) ao IMP e 4% (1/21) a AMC. Na espécie *Enterococcus faecalis*, 50% (1/2) a AMO, 50% (1/2) ao CIP, 50% (1/2) ao IMP e 50% (1/2) GEN, sendo a resistência ao SUT e a CFO intrínseca. Na espécie *Klebsiella pneumoniae* 100% (4/4) das cepas foram resistentes a AMO, 75% (3/4) a CIP, 50% (2/4) ao IMP, 50% (2/4) a SUT, 25% (1/4) a GEN e 25% (1/4) a AMC. Das 11 cepas de *Bordetella hinzii* 100% (11/11) foram resistentes a CFO, 81% (9/11) a AMO, 18% (2/11) ao SUT, 18% (2/11) a GEN, 18% (2/11) a AMC, 18% (2/11) a CIP e 9% (1/11) a IMP. Das 3 cepas de *Salmonella* spp. 100% (3/3) foram resistentes a AMO, 33% (1/3) a CFO, 33% (1/3) a CIP.

Das duas cepas de *Enterobacter cloacae* 50% (1/2) apresentaram resistência ao SUT e 50% (1/2) ao IMP, sendo observada resistência intrínseca a AMO, AMC e CFO. A única cepa de *Acinetobacter iwoffii* apresentou resistência a GEN e SUT, porém foi observada resistência intrínseca a AMO. Na espécie *Leclercia adecarboxylata* foi observada resistência a AMO e SUT. A única cepa de *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou resistência ao IMP, enquanto a resistência observada a AMO, AMC, CFO e SUT são intrínsecas da espécie.

Na granja 2 92% (25/27) das cepas de *E. coli* oriundas de cloaca foram resistentes a COL, 77% (21/27) ao SUT, 51% (14/27) a GEN, 37% (10/27) a AMO, 22% (6/27) a CIP, 22% (6/27) a AMC e 18% (5/27) a CFO. Nas cepas de *P. mirabilis* foram observadas 80%

(4/5) de resistência a AMO, 80% (4/5) a GEN, 60% (3/5) ao SUT, 40% (2/5) CFO, 20% (1/5) ao CIP. Na espécie *K. pneumoniae* foi observado 100% (2/2) de resistência a GEN, 50% (1/2) ao SUT, 50% (1/2) a CIP, 50% (1/2) a AMO. A única cepa de *Enterococcus faecalis* apresentou resistência a IMP e a GEN, sendo observada resistência intrínseca a CFO e SUT.

Das 21 cepas de *E. coli* originárias de traqueia da granja 2 95% (20/21) apresentaram resistência a COL, 85% (18/21) ao SUT, 80% (17/21) a GEN, 33% (7/21) a CIP, 28% (6/21) a AMO e 14% (3/21) a CFO. Nas cepas de *P. mirabilis* foi observado 100% (3/3) de resistência ao SUT, 100% (3/3) a GEN, 66% (2/3) a CFO, 66% (2/3) a CIP, 66% (2/3) a AMO e 33% (1/3) ao IMP. Na espécie *E. faecalis* foi observado 75% (3/4) a GEN, 50% (2/4) a CIP, 25% (1/4) a AMO e 25% (1/4) a IMP, sendo a resistência a CFO e SUT intrínseca. As cepas de *K. pneumoniae* apresentaram 100% (2/2) de resistência ao SUT, 50% (1/2) a AMO, 50% (1/2) a AMC, 50% (1/2) a CFO, 50% (1/2) a CIP, a 50% (1/2) a IMP e 50% (1/2) a GEN. Nas cepas de *B. hinzii* foram observados que 83% (5/6) foram resistentes ao CFO, 66% (4/6) a CIP, 50% (3/6) ao SUT, 50% (3/6) a GEN e 33% (2/6) a AMO, enquanto na espécie *B. avium* foi observado 16% (1/6) de resistência a GEN. Na espécie *Enterobacter cloacae* foram observadas resistências em 66% (2/3) a CIP, 66% (2/3) a IMP, 33% (1/3) a GEN, sendo as resistências a AMO, AMC e CFO intrínsecas. Dos dois isolados de *Enterococcus hirae*, 100% (2/2) foram resistentes a CIP, 100% (2/2) a GEN, sendo observada resistência intrínseca a AMO e CFO.

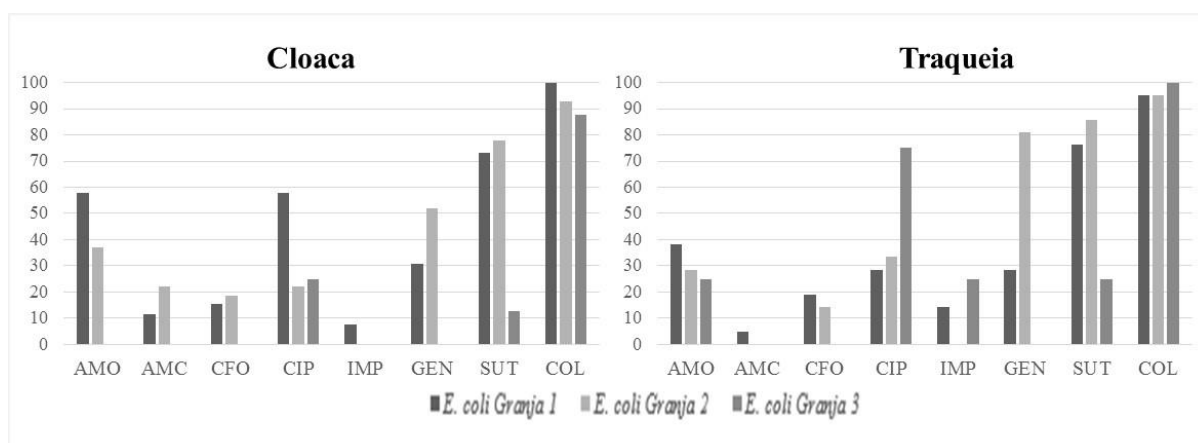


Figura 7 - Gráfico apresentando o percentual de resistência fenotípica nos isolados de *Escherichia coli* de amostras de cloaca e de traqueia nas três granjas.

4.3.1 Panorama da resistência fenotípica antimicrobiana em cepas de *E. coli*

Na granja 3 foi observado nas cepas de *E. coli* de cloaca 87% (7/8) de resistência a COL, 25% (2/8) a CIP, 12% (2/8) a SUT, enquanto nas cepas oriundas de traqueia 100% (4/4) apresentaram resistência fenotípica a COL, 75% (3/4) a CIP, 25% (1/4) a IMP, 25% (1/4) ao SUT.

Ao analisar a resistência fenotípica frente aos antimicrobianos testados, verificou-se que a colistina ($\geq 85\%$) apresentou elevados índices de resistência em cepas de *E. coli* nas três granjas estudadas (100% granja 1 cloaca, 95% granja 1 traqueia, 92% granja 2 cloaca, 95% granja 2 traqueia, 87% granja 3 cloaca, 100% granja 3 traqueia). Ao avaliar *E. coli* oriundas de swab de cloaca de frangos do Vietnã, Nguyen et al (2016) encontrou 22% de resistência ao mesmo antimicrobiano. Bem como Fernandes et al (2016) que ao avaliar a coleção de cepas de *E. coli* coletadas de frango de corte entre 2000 a 2016 no Brasil observou que apenas 40% foram resistentes a colistina. Em estudo recente realizado no Iran por Azizpour & Saeidi (2018) foi observado que 68% foram resistentes ao antimicrobiano.

Altos índices de resistência também foram encontrados ao antimicrobiano Sulfametoprim (SUT) nas granjas 1 (73% cloaca, 76% traqueia) e 2 (77% cloaca e 85% traqueia), acreditamos que, tal fato, pode estar relacionado ao contexto histórico de uma elevada densidade de criadores e a antiga utilização dessa classe de antimicrobianos em plantéis avícolas na região serrana. No entanto, os valores observados na granja 3 (12% cloaca, 25% traqueia) foram consideravelmente inferiores quando comparados com as granjas 1 e 2, levando ao entendimento que tal fato pode estar relacionado à baixa densidade de produtores de aves e a recente tendência de criadores de aves orgânicas e caipiras na região norte do estado. Elevados níveis de resistência ao SUT (80%) também foram observados por Azizpour & Saeidi (2018) ao estudar isolados de *E. coli* de frangos de corte com sinais clínicos de colibacilose, o que pode estar relacionado ao uso deste em tratamentos de quadros sistêmicos (colibacilose) e doenças localizadas (aerossaculite e osteomielite) (AGUNOS et al., 2017).

Cepas de *E. coli* também apresentaram resistência quanto a gentamicina. A granja 1 obteve resistência em 31% de cepas de cloaca e 28% em cepas de traqueia e a granja 2, 52% naquelas que estavam presentes na cloaca e 81% nas cepas de traqueia, porém na granja 3 não foi observada resistência a referida droga, tais níveis também se assemelham aos encontrados por Nguyen e colaboradores (2016) em frangos de corte que observaram 42% de cepas de *E. coli* resistentes. Durante o levantamento realizado nas visitas às granjas, verificou-se a utilização do promotor de crescimento enramicina nas granjas 1 e 2 e colistina na granja 3, a enramicina é uma estreptomicina pertencente a classe dos aminoglicosídeos, mesma classe da gentamicina. Dessa forma, a resistência verificada nos testes fenotípicos poderia ser explicada pela utilização da enramicina como promotor de crescimento conforme observado por Costa e colaboradores (2017).

Em relação à ciprofloxacina foi possível obter os seguintes resultados: 58% e 28% das cepas (cloaca e traqueia, respectivamente) da granja 1 foram resistentes, na granja 2, 22% das cepas de cloaca e 33% de traqueia, além de 25% da cloaca e 75% de traqueia em cepas pertencentes a granja 3. Nguyen e colaboradores (2016) observaram 73% de resistência ao referido antimicrobiano ao estudar *E. coli* de origem aviária no Vietnã. Hachesoo et al (2017) ao pesquisar a resistência a quinolonas em granjas de frango de corte no Irã isolou 80% de cepas de *E. coli* resistentes oriundas de cloaca de frangos com trinta dias de vida, resultados esses próximos aos obtidos por Azizpour & Saeidi (2018) que obtiveram 77%. A ciprofloxacina pertence à classe das quinolonas, assim como a enrofloxacin, que é amplamente utilizada de forma terapêutica e profilática a campo. No levantamento realizado nas granjas durante as visitas, a granja 1 e granja 3 apresentaram histórico de uso recente da enrofloxacin. A granja 1 fez uso do antimicrobiano no lote anterior ao pesquisado e já a granja 3, a utilização do fármaco se deu nos últimos três meses anteriores a coleta, em ambas as granjas este foi utilizado para conter a doença colibacilose.

Índices consideráveis de resistência a amoxicilina também foram observados, tendo as cepas de *E. coli* de cloaca da granja 1 apresentado maior percentual (57%) seguido pelas cepas de traqueia da granja 1 (38%), cloaca da granja 2 (37%), traqueia da granja 2 (28%) e traqueia da granja 3 (25%), não foi observada resistência nas cepas de cloaca da granja 3. Esta resistência pode estar relacionada a produção de beta-lactamase pois foi observado que 52/107 (48%) cepas de *E. coli* foram suspeitas de produzirem a referida enzima pelo resultado do teste de difusão em disco.

4.3.2 Resistência a vancomicina em cepas de *Enterococcus* spp.

No teste de detecção da resistência à vancomicina por Ágar Screen não foram observados crescimentos, demonstrando que as onze cepas testadas foram sensíveis. Baixa prevalência de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina foram observados tanto nos estudos realizados por Braga et al. (2017), que pesquisou a resistência a diferentes antimicrobianos em

cepas *Enterococcus faecalis* oriundos de casos de osteomielite na região sudeste do Brasil, quanto no de Unal et al (2017), onde foram observados 5,06% e 8,3% respectivamente.

4.3.3 Análise da produção de β -lactamases em cepas de *Escherichia coli* e *Bordetella* spp. e outras bactérias.

Dentre as cepas de *Escherichia coli* e *Bordetella* spp. que apresentaram resistência à AMC, AMO e CFO no teste de disco difusão de triagem, 52/107 (48,59%) *E. coli* e 16/17 (94%) *B. hinzii* foram submetidas à pesquisa de β -lactamases. Considerando a espécie *E. coli*, 12/52 (23,07%) cepas que apresentaram resultados fenotípicos compatíveis com os de produtores de ESBL, representando 11% da população avaliada (12/107). Duas cepas apresentaram perfil de produção de AmpC (2/52; 3%) e cinco (5/52; 9%) apresentaram resultados compatíveis com a coprodução de ambas as enzimas, representando 2% (2/107) e 4% (5/107), respectivamente, da população avaliada. Ao avaliar a prevalência por granja, foi observado que 27% (13/47) das cepas de *E. coli* da granja 1 apresentaram produção de beta-lactamase, sendo 61% (8/13) ESBL, 15% (2/13) AmpC e 23% (3/13) coprodução de enzimas, enquanto na granja 2 10% (5/48) apresentaram produção de beta-lactamase, sendo 60% (3/5) apenas de ESBL e 40% (2/5) coprodução de enzimas. Na granja 3 8% (1/12) apresentou perfil de produção apenas da enzima ESBL. Das dezesseis cepas de *B. hinzii*, todas apresentaram perfil produtor de β -lactamases, apresentando 94% de resistência à cefoxitina, 11% à AMC e 35% à CAZ.

No teste confirmatório 100% (4/4) cepas de *Enterobacter cloacae* foram identificadas como possíveis produtoras de AmpC, assim como 100% (1/1) de *Pseudomonas aeruginosa*, a produção desse tipo de beta-lactamase é característica intrínseca de ambas espécies, pois possuem genes cromossômicos que codificam a produção das referidas enzimas. Na espécie *Klebsiella pneumoniae* foi identificado 33% (1/3) como possível produtor de ESBL.

4.3.4 Detecção de genes relacionados a resistência em cepas de *E. coli*

Dentre as 107 cepas de *E. coli* avaliadas, 94 (88%) apresentaram algum gene relacionado a resistência. Em 18% (19/107) foi detectado apenas um gene; em 17% (18/107) foram detectados dois genes; em 16% (17/107) três genes; em 15% (16/107) quatro genes; em 7% (8/107) cinco genes; em 6% (6/107) seis genes; em 5% (5/107) sete genes; em 2% (2/107) oito genes; em 2% (2/107) nove genes e em 0,9% (1/107) foram detectados dez genes de resistência.

O gene mais prevalente foi o *mcr-1* e esteve presente em 58% (62/107) das cepas, todas apresentaram resistência fenotípica a colistina, porém 39% (40/102) foram resistentes no teste fenotípico e não apresentaram o gene *mcr-1*, demonstrando a necessidade de futuros estudos em relação a variabilidade genética deste, conforme relatos recentes (YIN et al., 2017). A IN-45 de 22 de novembro de 2016 que proíbe o uso como aditivo, é uma tentativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em diminuir os níveis de resistência a colistina encontrados a campo. Entretanto é cedo para afirmar se tal medida irá surtir efeito, uma vez que, o uso da forma terapêutica e profilática ainda é permitido.

Em relação a resistência a gentamicina, houve correlação da resistência fenotípica e genotípica em 40% (18/45) das cepas avaliadas. O gene *aadA* foi o mais relacionado a resistência fenotípica, pois 75% (9/12) das cepas que possuíam tal gene expressaram resistência no teste de difusão em disco, seguido pelos genes *aac3-VIb* com 50% (4/8), *aph(3)IA* com 50% (11/22) e *aac3-VIa* com 38% (5/13).

O SUT foi o segundo antimicrobiano com maior índice de resistência fenotípica no teste de difusão em disco (71%; 76/107), havendo correlação fenotípica e genotípica em 15,78% (12/76) das cepas avaliadas. Sendo 12/17 (71%) cepas que possuíam o gene *sull* e 20/28 (71%) que possuíam o gene *dfr-17* apresentaram resistência fenotípica ao SUT. No en-

tanto 64% (49/76) apresentaram resistência fenotípica e nenhum dos dois genes foram detectados.

O gene *bla*_{TEM} foi detectado em 15% (16/107) das cepas de *E. coli*, porém apenas 25% (4/16) das cepas que possuíam o gene foram consideradas produtoras de ESBL nos testes fenotípicos, isso pode ser explicado pois existem variantes de espectro estendido do referido gene. A prevalência dos genes relacionados a resistência encontra-se na tabela 1.

Tabela 1. Genes associados a resistência em cepas de *E. coli*

| Antimicrobiano | Genes | % |
|-----------------------|-------------------|-------------|
| Colistina | <i>mcr1</i> | 58 (62/107) |
| Prata | <i>silP</i> | 6 (7/107) |
| Cobre | <i>pcoD</i> | 14 (15/107) |
| Sulfa | <i>sulI</i> | 16 (17/107) |
| Trimetopina | <i>dfr17</i> | 27 (29/107) |
| Aminoglicosídeo | <i>aadA</i> | 11 (12/107) |
| Gentamicina | <i>aac3-VIb</i> | 7 (8/107) |
| Gentamicina | <i>aph(3)IA</i> | 20 (22/107) |
| Gentamicina | <i>aac3-VIa</i> | 12 (13/107) |
| Quaternário de Amônio | <i>qac delta1</i> | 16 (17/107) |
| Ampicilina | <i>blaTEM</i> | 15 (16/107) |
| Tetraciclina | <i>tetB</i> | 22 (24/107) |
| Tetraciclina | <i>tetA</i> | 28 (30/107) |

4.3.5 Capacidade de acumulação de genes de resistência e risco de transmissão para outras bactérias

Dentre os dezessete grupos de incompatibilidade de plasmídeos avaliados, os três mais prevalentes foram *incI2*, *B/O* e *FIB* com 32% (34/107), 28% (30/107) e 36% (39/107), respectivamente. Quando correlacionada a prevalência destes plasmídeos com a presença do gene *mcr-1*, foi observada maior ocorrência deste gene de resistência nas cepas onde estes plasmídeos foram detectados isoladamente e concomitantemente (tabela 2 e 3).

O gene que codifica a enzima integrase (*intI1*) foi detectado em 10% (11/107) das cepas de *E. coli* e 13% (8/62) das cepas *mcr-1* positivas. A detecção do gene *intI1* está correlacionada com a presença de integrons, que são elementos genéticos que contém um sistema de recombinação sítio-específica capaz de integrar, expressar elementos de DNA específicos, chamados de cassetes gênicos (HALL & COLLIS, 1995). Os integrons consistem de três elementos: o gene que codifica a tirosina recombinase (integrase, codificada pelo gene *intI*), necessária para recombinação sítio específica dos cassetes gênicos dentro do integron, o sítio de recombinação sítio específica (*attI*), que é reconhecido pela integrase; e o promotor (P_c) localizado *upstream* do sítio de integração, necessário para eficiente transcrição e expressão do cassete gênico presente no integron. A maioria dos cassetes presentes em integrons já descritos codificam determinantes de resistência, e estes elementos genéticos parecem ter um papel importante na propagação de resistência antimicrobiana em bactérias Gram negativas (PLOY et al., 2000).

Foram observados nas cepas B75 e B93 que foram positivas para o gene *intI1* a presença concomitante dos genes de resistência a amônia quaternária (*qac delta1*) e sulfonamidas (*sulI*), tais características estão relacionadas a presença do integron de classe 1, que possui conservado em sua região *downstream* os referidos genes (RECCHIA et al., 1997).

Foi detectada também a presença do gene que codifica enzima transposase (*iseC12*) em 13% (14/107) das cepas de *E. coli* e 10% (6/62) nas cepas *mcr-1* positivas. Os transposons são

elementos genéticos que se movimentam no genoma através da ação da enzima transposase. Esta movimentação pode ocorrer tanto dentro do cromossomo quanto entre cromossomo e plasmídeo. Os transposons pode conter integrons, facilitando a transmissão de genes de resistência entre bactérias.

Não se pode afirmar que o gene *mcr-1* está contido no plasmídeo, integron ou transposon, porém a ocorrência destes elementos em cepas *mcr-1* positivas pode ser considerada um fator de risco, uma vez que o gene *mcr-1* pode ser movido para estes elementos genéticos móveis, facilitando a dispersão do gene. Tais características foram observadas na cepa B48, onde foram detectados os genes *mcr-1*, *intl1*, *isec12* e plasmídeos *incI2*, *FIB*.

Tabela 2 - Prevalência dos plasmídeos e dos genes de acúmulo e transmissão de resistência correlacionados com a presença do gene *mcr-1* em cepas de *E. coli*

| Genes | Cepas % | <i>mcr-1</i> gene % |
|---------------|-------------|---------------------|
| <i>Intl1</i> | 10 (11/107) | 13 (8/62) |
| <i>IsEc12</i> | 13 (14/107) | 10 (6/62) |
| <i>incI2</i> | 32 (34/107) | 37 (23/62) |
| <i>T</i> | 0.00 | 0.00 |
| <i>P</i> | 10 (11/107) | 6 (4/62) |
| <i>A/C</i> | 0.9 (1/107) | 0.00 |
| <i>FIC</i> | 2 (2/107) | 0.00 |
| <i>B/O</i> | 28 (30/107) | 34 (21/62) |
| <i>Y</i> | 0.9 (1/107) | 0.00 |
| <i>FIB</i> | 36 (39/107) | 35 (22/62) |
| <i>FIA</i> | 3 (3/107) | 2 (1/62) |
| <i>FIIA</i> | 0.00 | 0.00 |
| <i>W</i> | 0.00 | 0.00 |
| <i>K/B</i> | 5 (5/107) | 3 (2/62) |
| <i>L/M</i> | 15 (16/107) | 16 (10/62) |
| <i>HI2</i> | 7 (8/107) | 10 (6/62) |
| <i>N</i> | 12 (13/107) | 14 (9/62) |
| <i>HII</i> | 7 (8/107) | 11 (7/62) |
| <i>X</i> | 0.9 (1/107) | 0.00 |
| <i>II</i> | 22 (24/107) | 22 (14/107) |

Tabela 3 - Relação de número de cepas positivas para o gene *mcr-1* em relação aos plasmídeos e aos genes de acúmulo e transmissão de resistência

| Nº de amostras <i>mcr-1</i> positivo | Conjunto de genes |
|--------------------------------------|-------------------------|
| 1 | <i>Intl1, II</i> |
| 1 | <i>incI2, II</i> |
| 1 | <i>B/O, FIB</i> |
| 1 | <i>incI2, HII</i> |
| 1 | <i>IsEc12, II</i> |
| 1 | <i>B/O, L/M</i> |
| 1 | <i>Intl1, B/O</i> |
| 1 | <i>P, N</i> |
| 1 | <i>Intl1, B/O, FIB</i> |
| 1 | <i>IsEc12, FIB, K/B</i> |
| 1 | <i>incI2, FIB, II</i> |
| 1 | <i>IsEc12, FIB, K/B</i> |

| | |
|----|--|
| 1 | <i>intI1</i> , <i>incI2</i> , B/O |
| 1 | <i>isecI2</i> , <i>FIB</i> , <i>II</i> |
| 1 | <i>P</i> , B/O, <i>FIB</i> , <i>L/M</i> |
| 1 | <i>IntI1</i> , B/O, <i>FIB</i> , <i>II</i> |
| 1 | <i>L/M</i> , <i>HI2</i> , <i>N</i> , <i>HII</i> |
| 1 | <i>incI2</i> , <i>L/M</i> , <i>HI2</i> , <i>N</i> , <i>HII</i> |
| 1 | <i>incI2</i> , <i>L/M</i> , <i>HI2</i> , <i>HII</i> |
| 1 | <i>IsEcI2</i> , <i>incI2</i> , B/O, <i>FIB</i> |
| 1 | <i>FIB</i> , K/B, <i>L/M</i> , <i>N</i> |
| 1 | <i>incI2</i> , B/O, <i>FIB</i> , <i>II</i> |
| 1 | B/O, <i>L/M</i> , <i>N</i> , <i>HII</i> |
| 1 | <i>incI2</i> , <i>P</i> , <i>FIB</i> , <i>N</i> , <i>HII</i> |
| 1 | <i>incI2</i> , <i>FIB</i> , <i>FIA</i> , <i>HI2</i> , <i>N</i> |
| 1 | <i>incI2</i> , <i>FIB</i> , <i>FIA</i> , <i>HI2</i> , <i>N</i> |
| 1 | <i>P</i> , B/O, <i>FIB</i> , <i>L/M</i> , <i>N</i> |
| 1 | <i>IsEcI2</i> , <i>incI2</i> , B/O, <i>N</i> , <i>HII</i> |
| 1 | <i>IntI1</i> , <i>IsEcI2</i> , <i>incI2</i> , B/O, <i>FIB</i> |
| 2 | <i>FIB</i> |
| 2 | <i>HI2</i> , <i>II</i> |
| 2 | <i>FIB</i> , <i>II</i> |
| 3 | <i>II</i> |
| 3 | <i>incI2</i> |
| 3 | <i>incI2</i> , B/O |
| 4 | <i>IntI1</i> |
| 5 | <i>incI2</i> , B/O, <i>FIB</i> |
| 11 | Nenhum gene |

4.3.6 Detecção de genes relacionados a virulência em cepas de *E. coli*

Dentro do grupo de genes de virulência utilizados para caracterização das cepas como APEC o gene que apresentou maior prevalência foi *iutA*, seguido pelo *iss*, *ompT*, *hlyF*, *iroN* com 49%, 39%, 33%, 30% e 22% respectivamente. Das 107 cepas de *E. coli* analisadas 31% (33/107) foram caracterizadas como APEC, pois possuíam três ou mais genes de virulência concomitantemente (tabela 4).

Tabela 4 - Preditores mínimos para APEC.

| Fatores de virulência | Genes | % |
|--|-------------|-------------|
| Receptor siderofilo samochelin | <i>iroN</i> | 22 (24/107) |
| Codificador de protease de membrana externa epissomal | <i>ompT</i> | 33 (36/107) |
| Codificador de hemolisina putativa de <i>E. coli</i> aviária | <i>hlyF</i> | 30 (33/107) |
| Sobrevivência ao soro | <i>iss</i> | 39 (42/107) |
| Receptor de siderofilo aerobactina | <i>iutA</i> | 49 (53/107) |
| APEC-like | | 31 (33/107) |

A maior concentração de cepas caracterizadas como APEC ocorreu na granja 1 (40%; 19/47), sendo 38% (10/26) de cloaca e 42% (9/21) de traqueia, na granja 2 25% (12/48) das cepas foram consideradas APEC, sendo 22% (6/27) das cepas de cloaca e 28% (6/21) das de traqueia. Na granja 3 16% (2/12) das cepas foram consideradas patogênicas estando em maior proporção na traqueia (25%; 1/4) em relação a cloaca (12%; 1/8) (Figura 8 e 9).

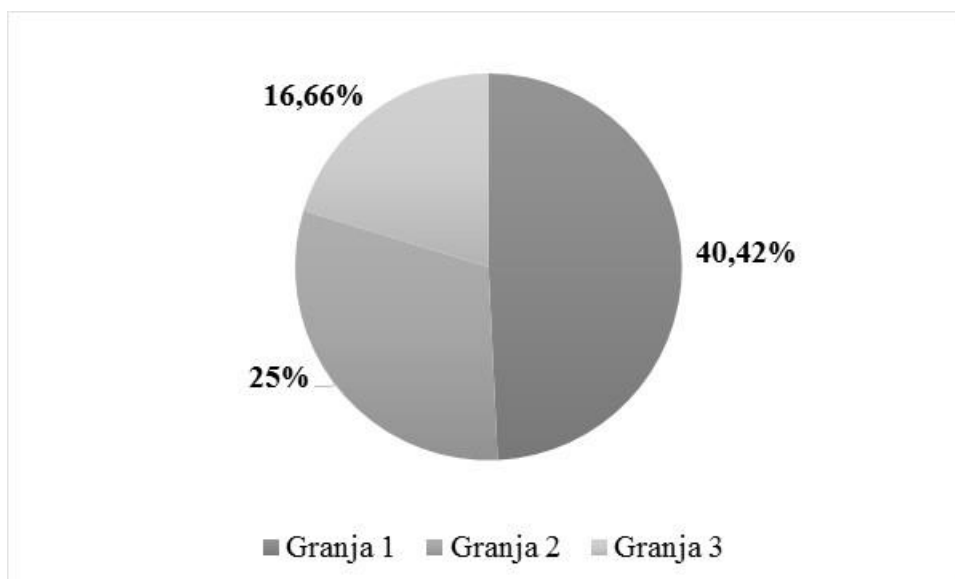


Figura 9 - Dispersão das cepas consideradas APEC por granja avaliada.

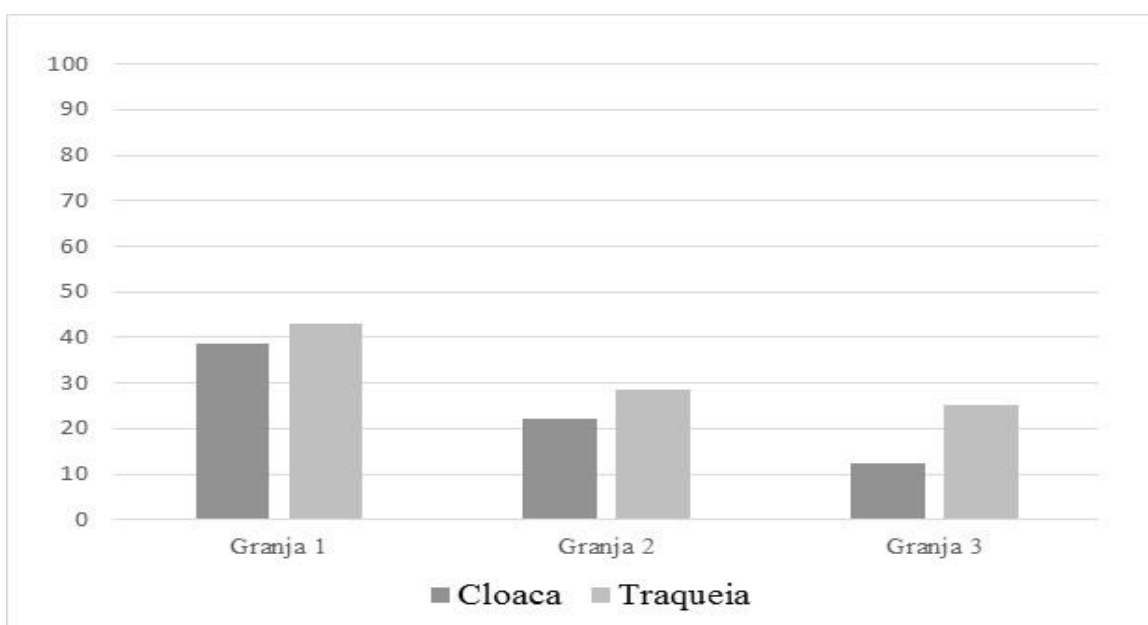


Figura 8 - Dispersão das cepas consideradas APEC nas diferentes granjas e órgãos avaliados

A prevalência de cepas APEC observada na granja 1 está relacionada a ocorrência de um quadro de colibacilose, decorrente de onfalite, na primeira semana de vida dos animais que compuseram o lote analisado na segunda coleta. O controle da doença foi feito pelo tratamento antimicrobiano e descarte das carcaças dos animais mortos. Apesar disto, foi detectado que 50% das cepas de *E. coli* (11/22) isoladas dos animais sobreviventes aos 36 dias de vida eram classificadas como APEC, elevando a taxa de ocorrência nesta propriedade (Figura 9).

4.3.7 Variabilidade genética das cepas de *Escherichia coli*

Ao avaliar os resultados obtidos através da técnica de Pulsed-field, podemos observar que houve uma grande variabilidade genética dentro das cepas de *Escherichia coli*. Porém houve similaridade de 100% entre os isolados B74, B75, B80, entre o B66 e B100 e entre o B39 e B42 (figura 10).

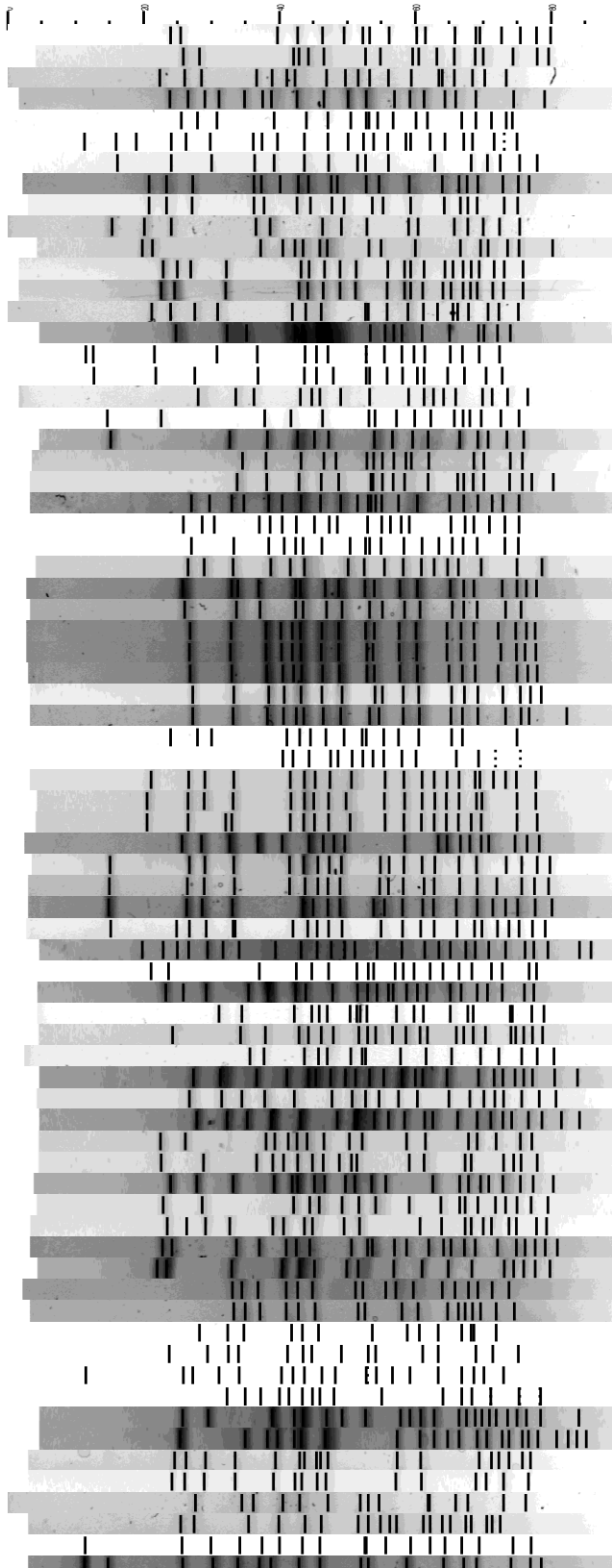
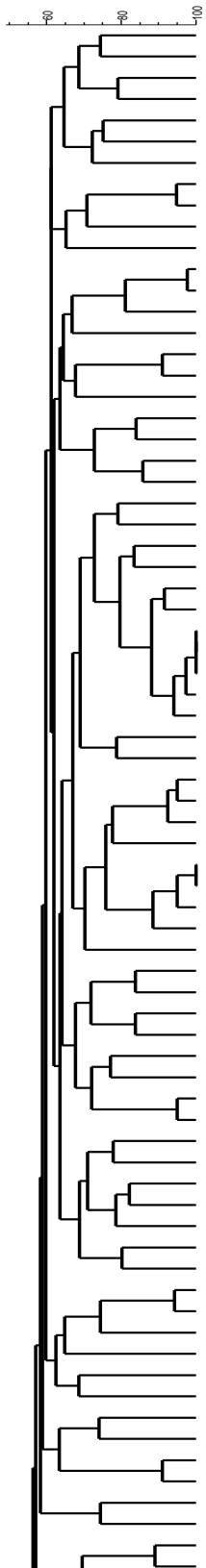
As cepas B74, B75 e B80, oriundas de traqueia e coletadas na granja 2, foram resistentes a COL, GEN, SUT, e positivas para os genes de resistência *mcr-1*, *bla*_{TEM}, *tetA*, *tetB*. Foi observada variabilidade quanto a presença dos genes *intl-1*, *pcoD*, *sull*, *aadA*, *aac3-VIb*, *qacE*. Quanto aos plasmídeos, todas foram positivas para *B/O* e *FIB* sendo que apenas a cepa B80 foi positiva para o *II*. Quanto a presença de genes de virulência, foram detectados nas três cepas o *iroN* e *iutA*. Quanto a classificação no grupo filogenético as três foram classificadas como F.

As cepas B66 e B100 são originárias de cloaca e coletadas na granja 2, ambas apresentaram resistência fenotípica a COL e ao SUT, sendo que apenas a cepa B66 apresentou resistência a CIP. A cepa B66 apresentou o gene de resistência *tetA*, enquanto o gene *mcr-1* foi detectado apenas na B100. Quanto a detecção de plasmídeos, foram detectados os *incl2*, *L/M*, *HI2*, *N*, *HII* apenas na cepa B100. Não foram detectados genes de virulência em ambas as cepas. Quanto a classificação no grupo filogenético ambas foram classificadas como B1.

Avaliando o perfil das cepas B39 e B42 observou-se que ambas são oriundas de traqueia e coletadas na granja 1 e apresentaram resistência fenotípica a COL, porém o gene *mcr-1* foi detectado apenas na B42, enquanto o gene *tetA* foi detectado em ambas. O plasmídeo *incl2*, *B/O*, foi detectado nas duas cepas, porém os plasmídeos *FIB* e *II* estava presente apenas na B42. Quanto aos genes de virulência, foi detectado o *iss* e *iutA* apenas na cepa B42. Quanto a classificação no grupo filogenético ambas foram classificadas como B1.

PFGE X Ba1

PFGE X Ba1



| sample | farm | bird | sample site | Phylo |
|--------|------|------------------|-------------|-------|
| B106 | 2 | broiler | doaca | A |
| B207 | 3 | free range layer | doaca | A |
| B18 | 1 | broiler | doaca | E |
| B64 | 2 | broiler | doaca | D |
| B3 | 1 | broiler | doaca | D |
| B149 | 1 | broiler | doaca | E |
| B209 | 3 | free range layer | doaca | A |
| B67a | 2 | broiler | doaca | F |
| B112 | 2 | broiler | doaca | F |
| B22 | 1 | broiler | trachea | A |
| B143 | 2 | broiler | trachea | B1 |
| B60 | 2 | broiler | doaca | D |
| B63 | 2 | broiler | doaca | D |
| B12 | 1 | broiler | doaca | E |
| B215 | 3 | free range layer | doaca | B1 |
| B47 | 2 | broiler | doaca | D |
| B53 | 2 | broiler | doaca | D |
| B28 | 1 | broiler | trachea | A |
| B210 | 3 | free range layer | doaca | A |
| B216 | 3 | free range layer | doaca | A |
| B105 | 2 | broiler | doaca | D |
| B114 | 2 | broiler | doaca | D |
| B90 | 2 | broiler | trachea | F |
| B154 | 1 | broiler | doaca | D |
| B49 | 2 | broiler | doaca | F |
| B139 | 2 | broiler | doaca | B1 |
| B77 | 2 | broiler | trachea | F |
| B98 | 2 | broiler | trachea | F |
| B74 | 2 | broiler | trachea | F |
| B75 | 2 | broiler | trachea | F |
| B80 | 2 | broiler | trachea | F |
| B65 | 2 | broiler | doaca | F |
| B93 | 2 | broiler | trachea | F |
| B1 | 1 | broiler | doaca | E |
| B178 | 1 | broiler | trachea | B1 |
| B115 | 2 | broiler | doaca | B1 |
| B141 | 2 | broiler | doaca | B1 |
| B128 | 2 | broiler | trachea | B1 |
| B73 | 2 | broiler | trachea | B1 |
| B66 | 2 | broiler | doaca | B1 |
| B100 | 2 | broiler | doaca | B1 |
| B86 | 2 | broiler | trachea | B1 |
| B103 | 2 | broiler | doaca | B1 |
| B214 | 3 | free range layer | doaca | C |
| B145 | 2 | broiler | trachea | E |
| B155 | 1 | broiler | doaca | B1 |
| B32 | 1 | broiler | trachea | B1 |
| B150 | 1 | broiler | doaca | D |
| B29 | 1 | broiler | trachea | B1 |
| B201 | 1 | broiler | doaca | B1 |
| B205 | 3 | free range layer | doaca | B1 |
| B213 | 3 | free range layer | trachea | B1 |
| B148 | 1 | broiler | doaca | B1 |
| B153 | 1 | broiler | doaca | E |
| B122 | 2 | broiler | trachea | A |
| B157 | 1 | broiler | trachea | C |
| B113 | 2 | broiler | doaca | B1 |
| B87 | 2 | broiler | trachea | D |
| B147 | 1 | broiler | doaca | F |
| B69 | 2 | broiler | doaca | A |
| B96 | 2 | broiler | trachea | D |
| B133 | 2 | broiler | trachea | B1 |
| B180 | 1 | broiler | trachea | A |
| B48 | 2 | broiler | doaca | Un |
| B200 | 1 | broiler | doaca | B1 |
| B208 | 3 | free range layer | doaca | A |
| B211 | 3 | free range layer | trachea | A |
| B102 | 2 | broiler | doaca | B1 |
| B111 | 2 | broiler | doaca | B1 |
| B17 | 1 | broiler | doaca | B1 |
| B101 | 2 | broiler | doaca | A |
| B5 | 1 | broiler | doaca | F |

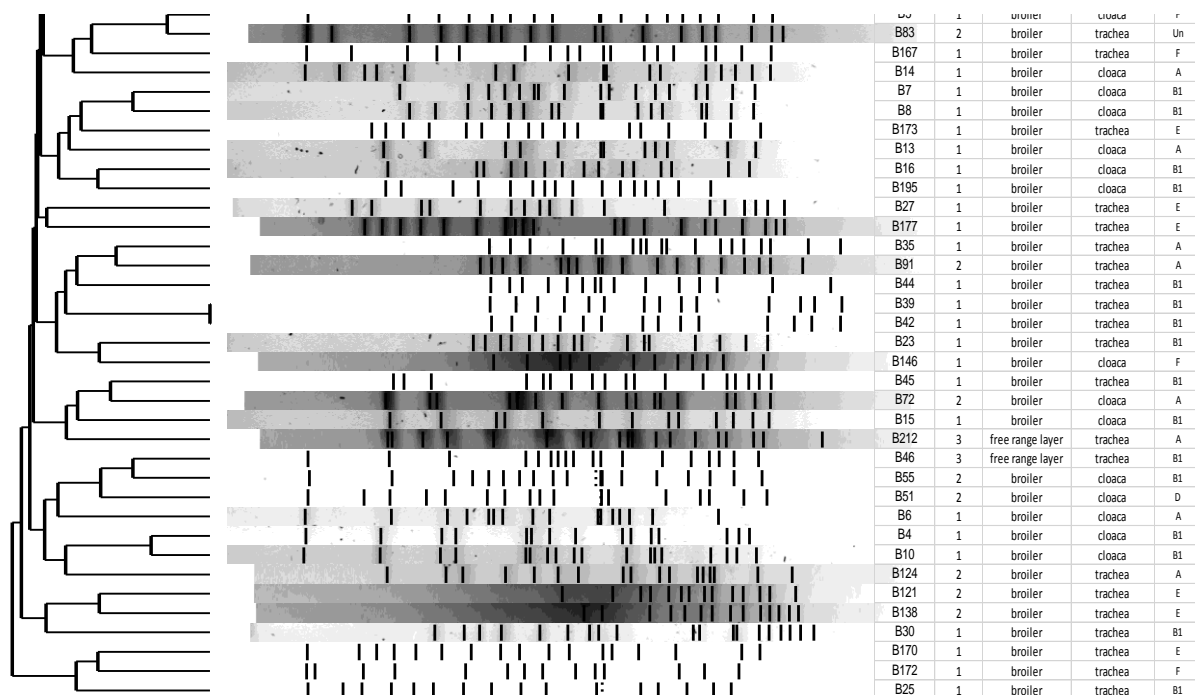


Figura 10 - A coluna "sample" mostra a designação do isolado; A coluna "farm", é a propriedade de origem das amostras a coluna "age", dias ou semanas de idade das aves; "bird" mostra a aptidão da ave; "sample site", órgão de origem da bactéria, e a última coluna Phylo mostra o grupo filogenético.

4.3.8 Grupos filogenéticos de *Escherichia coli*

A maioria das cepas foi classificada como pertencente ao grupo filogenético B1 (38%; 41/107), seguido do grupo F (15%; 16/107). Trinta e quatro cepas foram consideradas APEC, sendo que 9 (26%) e 7 (20%) encontravam-se distribuídas nos grupos B1 e F, respectivamente. A detecção do gene *mcr-1* foi positiva em 62 cepas, 22 (35%) pertencentes ao grupo B1 e 10 (16%) ao grupo F.

Os resultados encontrados foram diferentes dos observados por Rocha et al. (2017) que ao estudar cepas APEC e UPEC verificou prevalência do grupo filogenético D nas cepas APEC (31%) e B2 nas cepas UPEC (53%). Nos estudos de Rocha et al. (2017) o grupo filogenético B1 esteve presente em apenas 6% das cepas UPEC.

A prevalência dos outros grupos filogenéticos e a correlação entre a caracterização como APEC e presença do gene *mcr-1* podem ser observadas na tabela 5.

Tabela 5 - Prevalência dos grupos filogenéticos em relação a virulência e presença do gene *mcr-1*.

| Grupo filogenético | % | % APEC | % <i>mcr-1</i> positivo |
|--------------------|-------------|-----------|-------------------------|
| A | 11 (12/107) | 14 (5/34) | 19 (12/62) |
| B1 | 38 (41/107) | 26 (9/34) | 35 (22/62) |
| B2 | 0 | 0 | 0 |
| C | 2 (2/107) | 3 (1/34) | 1 (1/62) |
| D | 12 (13/107) | 6 (2/34) | 14 (9/62) |
| E | 11 (12/107) | 26 (9/34) | 9 (6/62) |
| F | 15 (16/107) | 20 (7/34) | 16 (10/62) |

4.3.9 Identificação e suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* Spp.

Após coleta de 120 amostras, sendo 60 de cloaca e 60 de traqueia, nas duas granjas, foram obtidos 88 isolados, os quais apenas 36 conseguiram ser identificados pela técnica de MALDI TOF MS, com boa pontuação (1.767 a 2.616). Os outros 52 isolados foram submetidos ao teste de resistência à novobiocina e de fermentação de açúcares, sendo 59% (31/52) identificados como *Staphylococcus gallinarum* e 40% (21/52) como outros ECNs. Do total de isolados obtidos, 36% (32/88) eram provenientes da granja 1 e 63% (56/88) da granja 2.

Na granja 1, um total de 37% (12/32) dos isolados foram oriundos de cloaca, enquanto 62% (20/32) de traqueia. Após análise das espécies, foi possível determinar prevalência da espécie *Staphylococcus gallinarum* em 40% (13/32), sendo identificadas também as espécies *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri*, e outros ECNs cujas distribuições percentuais, considerando os dois sítios de coleta, se encontram na figura 9.

Na granja 2, 44% (25/56) dos isolados foram oriundos da cloaca enquanto 55% (31/56) da traqueia. O *Staphylococcus gallinarum* também foi prevalente, identificado em 32% (18/56) dos isolados, sendo identificados também *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus aureus* e outros ECNs (figura 11).

A espécie mais prevalente isolada foi o *S. gallinarum* (35%; 31/88) seguido do *S. simulans* (17%; 15/88), tais resultados são diferentes dos encontrados por Heba et al. (2014) que ao estudar frangos de corte no Egito, encontrou 5% de *S. gallinarum* e 22% de *S. simulans*.

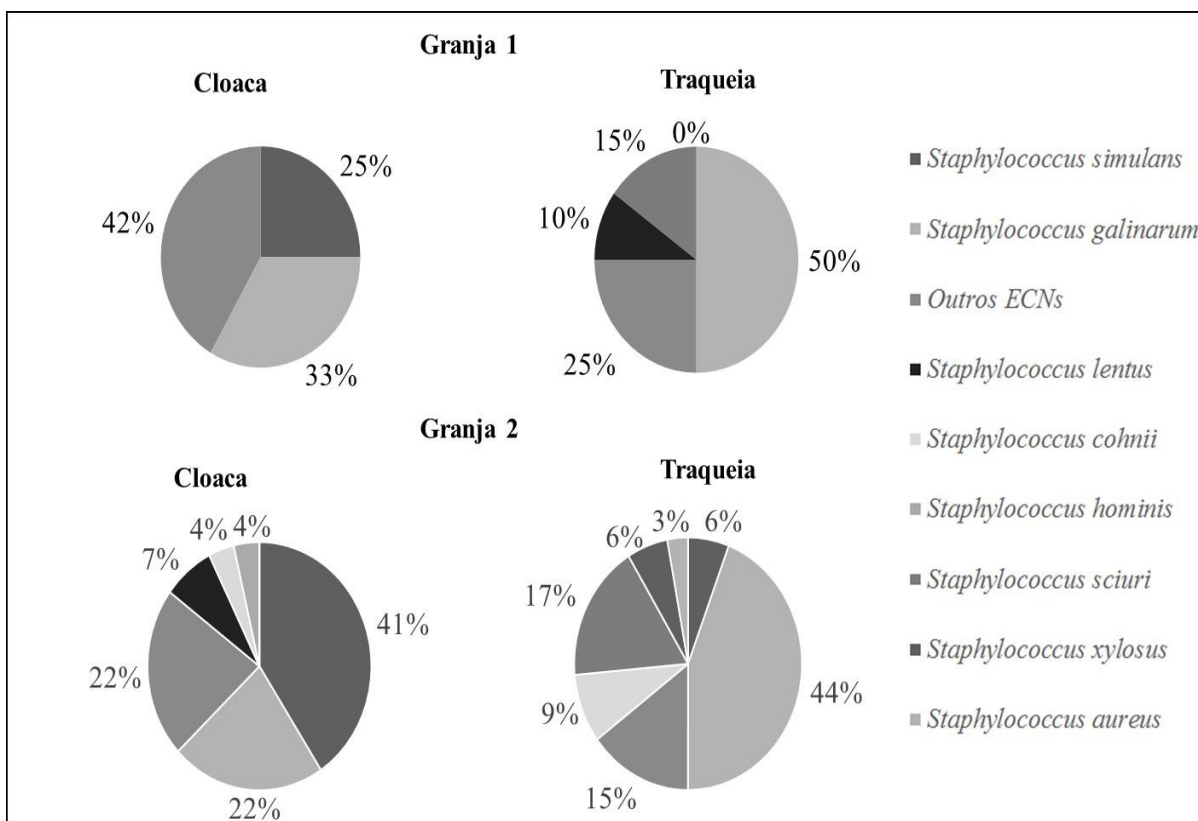


Figura 11 - Prevalência bacteriana de acordo com a origem da amostra.

Considerando os resultados obtidos a partir da técnica de disco difusão, os percentuais de resistência detectados nos *Staphylococcus* spp. isolados de cloaca e de traqueia nas granjas 1 e 2 estão expostos nas figuras 12, 13 e 14, 15, respectivamente.

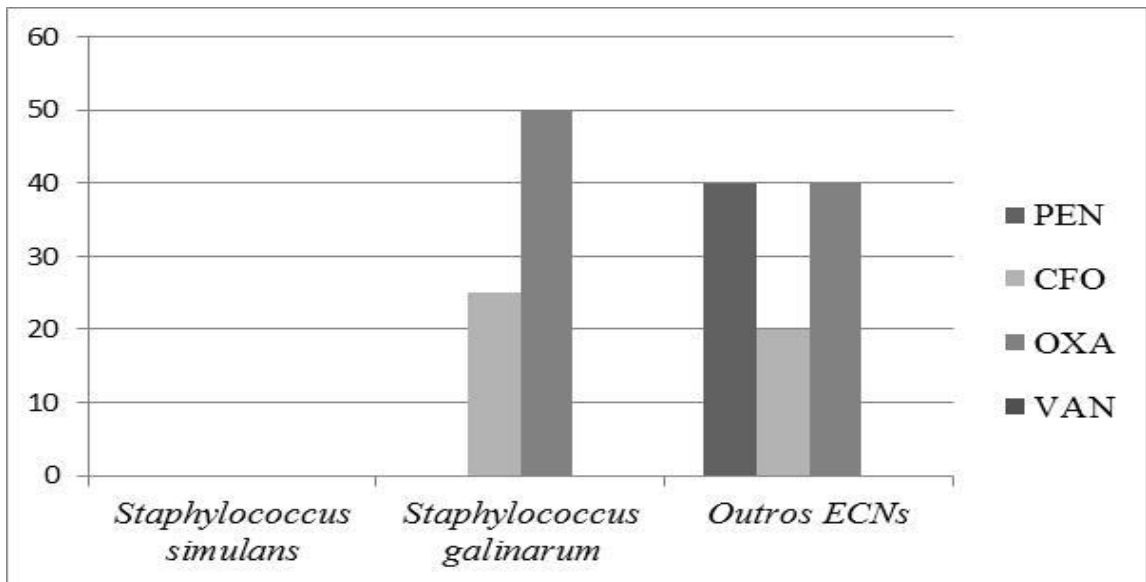


Figura 12 - Gráficos apresentando o percentual de resistência das espécies de estafilococos isolados de cloaca na granja 1. Legenda: PEN- penicilina, CFO- Cefoxitina, OXA- Oxacilina, VAN- Vancomicina.

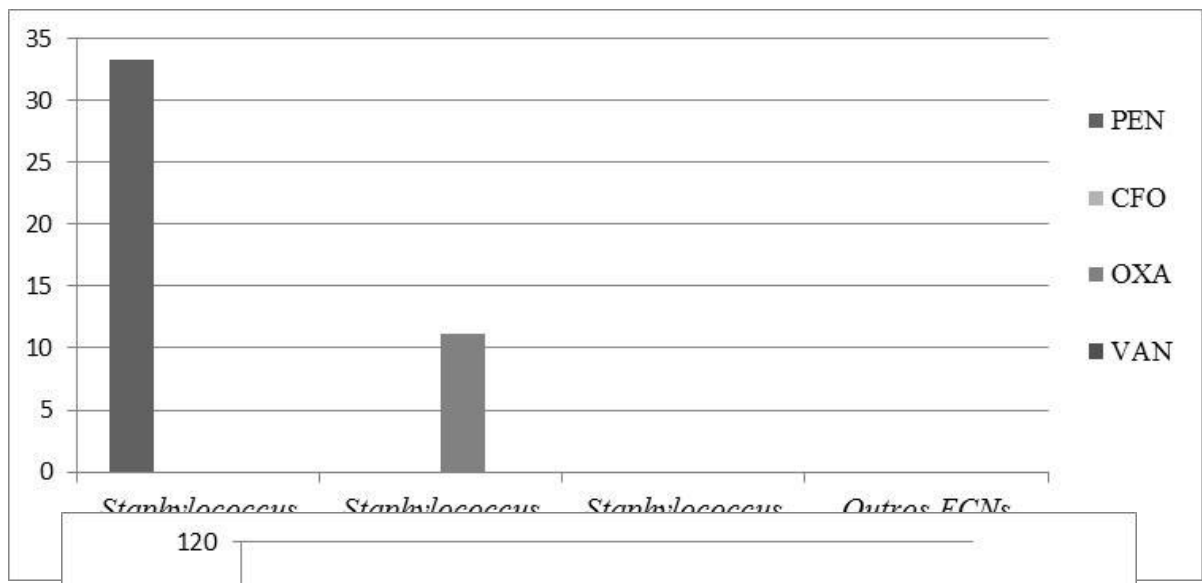


Figura 13 - Gráficos apresentando o percentual de resistência das espécies de estafilococos isolados de traqueia na granja 1. Legenda: PEN- penicilina, CFO- Cefoxitina, OXA- Oxacilina, VAN- Vancomicina.

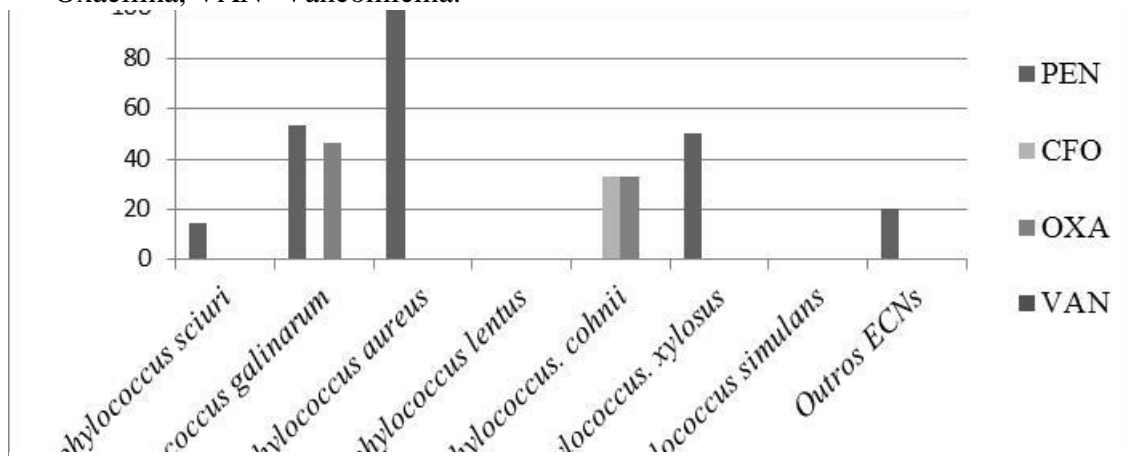


Figura 15 - Gráficos apresentando o percentual de resistência das espécies de estafilococos isolados de cloaca e tr na granja 2. Legenda: PEN- penicilina, CFO- Cefoxitina, OXA- Oxacilina, VAN- Vancomicina.

Dos isolados de *Staphylococcus* spp. 36% (32/88) apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos testados, sendo prevalente na espécie *S. gallinarum* com 47% (15/32). Os perfis de resistência apresentados no teste de difusão em disco foram: 14% (12/88) apresentaram resistência apenas a OXA, 10% (9/88) apresentaram resistência a PEN e apenas 1% (1/88) a CFO, enquanto 10% (9/88) foram resistentes a OXA e PEN e 2% (2/88) resistentes a PEN, OXA e CFO, conforme tabela 6.

A presença de cepas resistentes a oxacilina no presente estudo demonstra que 23% (23/88) podem ser estafilococos coagulase-negativos resistentes a meticilina, em estudo realizado por Ibadin et al. (2017) em hospital na Nigéria encontrou 46%, enquanto Rahimi et al. (2009) encontrou 60%. A pesquisa de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina em granjas de frango de corte é importante pois tais estabelecimentos podem servir como reservatório de bactérias resistentes a múltiplas drogas, podendo vir a causar infecções nosocomiais.

Tabela 6 - Correlação entre perfil de resistência x espécie gênero *Staphylococcus* spp.

| Perfil de resistência | Espécie | Número de cepas |
|-----------------------|----------------------|-----------------|
| PEN | <i>S. gallinarum</i> | 3 |
| | <i>S. sciuri</i> | 2 |
| | <i>S. xylosus</i> | 1 |
| | <i>S. aureus</i> | 1 |
| | Outros ECNs | 2 |
| OXA | <i>S. gallinarum</i> | 5 |
| | <i>S. simulans</i> | 3 |
| | <i>S. cohnii</i> | 1 |
| | <i>S. lentus</i> | 1 |
| | Outros ECNs | 2 |
| CFO | <i>S. cohnii</i> | 1 |
| PEN, OXA | <i>S. gallinarum</i> | 7 |
| | <i>S. cohnii</i> | 1 |
| | Outros ECNs | 1 |
| PEN, CFO, OXA | <i>S. gallinarum</i> | 1 |
| | Outros ECNs | 1 |

O gene *mecA* universal foi prevalente, sendo detectado em 7% (6/88) das cepas, seguido pelos genes *mecA* variante e *blaZ* com 6% (5/88) e 1% (1/88) respectivamente. Nenhuma cepa amplificou para o gene *mecA* de Murakami. A correlação entre os perfis de resistência fenotípica apresentados pelos isolados e a presença do gene *mecA* variante foi zero, enquanto dos genes *mecA* universal e *blaZ* foi de 1% (1/88). A correlação entre o *mecA* variante e o *mecA* universal foi de 100% (5/5), conforme tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição dos genes codificadores de resistência aos β -lactâmicos em cepas de *Sta-phylococcus* spp.

| Gene | Espécie | Número de cepas |
|-----------------------|--------------------|------------------------|
| <i>mecA</i> variante | <i>S. sciuri</i> | 4 |
| | <i>S. simulans</i> | 1 |
| <i>mecA</i> universal | <i>S. sciuri</i> | 4 |
| | <i>S. simulans</i> | 1 |
| | <i>S. aureus</i> | 1 |
| <i>blaZ</i> | <i>S. aureus</i> | 1 |

Os resultados mostraram que o primer e a metodologia descrita por Murakami et al. (1991) não deve ser utilizado na detecção do gene *mecA* em populações de aves de produção similarmente o que acontece em cepas oriundas de bovinos e suínos. Porém foram observadas cepas positivas para o *mecA* variante e *mec* “universal” possuindo uma correlação de 100% (5/5), tais resultados foram semelhantes aos encontrados por Melo et al. (2014) que observou que o primer *mecA* de Murakami et al. (1991) não anela em isolados de origem bovina.

5. CONCLUSÕES

A avaliação da microbiota bacteriana presente em amostras de cloaca e traqueia de frangos de corte permitiu observar a presença de várias espécies de enterobactérias, entretanto, houve elevada prevalência de *Escherichia coli* em ambos os órgãos avaliados independente da granja. Já dentre os *Staphylococcus* spp., houve prevalência das espécies coagulase-negativas, *S. gallinarum* seguida pelo *S. simulans*.

Ao avaliar a resistência aos antimicrobianos nas cepas isoladas observou-se que o perfil de resistência variou de acordo com o sistema de criação e histórico de uso de antimicrobianos de cada granja.

Foi encontrado elevado número de cepas de *Bordetella hinzii* resistentes a classe dos beta-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas e carbapenemas.

Foram encontradas cepas de *E. coli* com fenótipo sugestivo de produção de beta-lactamase do tipo ESBL e AmpC.

A resistência fenotípica a colistina foi a mais prevalente entre os isolados de *E. coli*, a qual foi acompanhada da também prevalente detecção do gene *mcr1*. Foram observadas elevadas correlações entre a presença do gene *mcr-1* e os plasmídeos *incI2*, *B/O*, *FIB*. Embora não se possa afirmar que o gene *mcr-1* está contido nos plasmídeos, a ocorrência de ambos em um mesmo indivíduo é considerado um fator de risco, uma vez que, o plasmídeo pode carrear o gene de resistência e favorecer a dispersão do mesmo.

Em contraste com a metodologia desenvolvida por Murakami et al. (1991) que não detectou o gene *mecA* nas cepas estudadas, a metodologia desenvolvida por Melo et al. (2013) obteve sucesso na detecção de suas variantes, com correlação de 100% entre os *primers mec SsciuriInt* e *mecA* universal, salientando a importância da adequação metodológica na detecção deste gene preditor de resistência aos beta-lactâmicos em cepas oriundas de animais de produção.

Foi observada elevada variabilidade genética das cepas *E. coli* com prevalência do grupo filogenético B1, relacionado a cepas comensais. Entretanto, a análise do perfil de virulência detectou elevado número de cepas APEC, salientando a importância do monitoramento, limpeza e desinfecção do ambiente, controle de pessoas e veículos e vazio sanitário dos galpões entre lotes, com o objetivo de evitar futuras ocorrências de colibacilose e consequentes perdas econômicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA, Relatório Anual 2017. <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2017> acessado em 20/01/2018
- AGGEN, J. B.; ARMSTRONG, E. S.; GOLDBLUM, A. A.; DOZZO, P.; LINSELL, M. S.; GLIEDT, M. J.; HILDEBRANDT, D. J.; FEENEY, L. A.; KUBO, A.; MATIAS, R. D.; LOPEZ, S.; GOMEZ, M.; WLASICHUK, K. B.; DIOKNO, R.; MILLER, G. H.; MOSER, H. E. Synthesis and spectrum of the neoglycoside ACHN-490. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 54, p. 4636-4642, 2010.
- AGUNOS, A.; LÉGER, D. F.; CARSON, C. A.; GOW, S. P.; BOSMAN, A.; IRWIN, R. J.; SMITH, R. J. R. Antimicrobial use surveillance in broiler chicken flocks in Canada, 2013-2015. *PLoS ONE*, v. 12, n. 6, p. e0179384, 2017.
- AKBAR, A. & KUMAR, A. A. Prevalence and antibiogram study of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in poultry meat; *Asian Pac J Trop Biomed*, v.3, n. 2, p. 163-168, 2013.
- ARVAND, M.; FELDHUES, R.; MIETH, M.; KRAUS, T.; VANDAMME, P. Chronic cholangitis caused by *Bordetella hinzii* in a liver transplant recipient. *J Clin Microbiol.*, v. 42, p. 2335-7, 2004.
- ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. <http://abpa-br.com.br/> acessado em 10/06/2017
- AYDIN, A.; SUDAGIDAN, M.; MURATOGLU, K. Prevalence of Staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *S. aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. *Journal of Food Microbiology*, v. 148, p. 99-106, 2011.
- AZIZPOUR, A. & SAEIDI, N. V. Investigation of antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with colibacillosis to ten antibacterial agents commonly used in the iranian poultry industry. **Journal of Comparative Pathobiology Iran Winter**, v. 14, n. 4, p. 59, 2018.
- BARROS M.R, Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* v. 31, n. 8, p. 672-676, 2011.
- BASS, L.; LIEBERT, C. A.; LEE, M. D.; SUMMERS, A. O.; WHITE, D. G.; THAYER, S. G.; MAURER, J. J. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, p. 2925-2929, 1999.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 27, p. 870-926, 2014.
- BERGERON, C. R; PRUSSING, C.; BOERLIN, P.; DAIGNAULT, D.; DUTIL, L.; REID-SMITH, R. J.; ZHANEL, G. G; MANGES, A. M. Chicken as reservoir for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 3, p. 415-421, 2012.
- BERTSCHINGER, H. U. & FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli* infections. In: STRAW, B.E. *Diseases of swine*, 5th ed., Iowa State University Press, p. 431-468, 1999.

BEZERRA, W. G. A.; SILVA, I. N. G.; VASCONCELOS, R. H. Isolation and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:6,8) in Broiler Chickens. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 44, p. 1364, 2016.

BOZORGMEHRI FARD, M. H.; KARIMI, V., FATHI, E., BEHMANESH, R. Bacteriologic survey on infectious cellulitis in broiler chickens in Masjid Soleiman slaughterhouse, Iran. *Archives of Razi Institute*, v.62, n. 2, p. 91-95, 2007.

BRAGA, J. F. V.; LEAL, C. A. G.; SILVA, C. C.; FERNANDES, A. A.; MARTINS, N. R. S.; ECCO, R. Genetic diversity and antimicrobial resistance profile of *Enterococcus faecalis* isolated from broilers with vertebral osteomyelitis in Southeast Brazil, *Avian Pathology*, v. 47, n. 1, p. 14-22, 2017.

BRAGA, J. F. V.; CHANTELOUP, N. K.; TROTIEREAU, A.; BAUCHERON, S.; GUABIRABA, R.; ECCO, R.; SCHOULER, C. Diversity of *Escherichia coli* strains involved in vertebral osteomyelitis and arthritis in broilers in Brazil. *BMC Veterinary Research*, v. 12, n.1, p. 140, 2016.

BRASIL, Abate de aves por UF. http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif_cons/%21sigsif.ap_quant_abate_cat_rep_cons?p_relatorio=abatidos_categoria_uf.rdf&p_id_especie=16&p_id_cat_animal=85&p_sg_uf=RJ&p_id_municipio=&p_data_ini=01/01/2015&p_data_fim=31/12/2017&p_serial=1239899760&p_id_especie=16&p_id_cat_animal=85&p_sg_uf=RJ&p_id_municipio=&p_data_ini=01/01/2015&p_data_fim=31/12/2016&p_serial=1239894587. Acessado em 20/01/2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial Sanitária de Produtos de Origem Animal, RIISPOA. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2017.

BRASIL, Aditivos Melhoradores de Desempenho e Antimicrobianos Registrados no CPAA/DFIP. http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivosdeinsumospecuarios/copy_of_ADITIVOSAUTORIZADOSCOMOMDeANTICOCIDIANOS201525abrilPortalMAPA.pdf. Acessado em 26/01/2018

BRASIL, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/sulfonamidas.htm. Acessado em 03/05/2018.

BRASIL, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/polimixinas.htm. Acessado em 03/05/2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 26 de 09 de julho de 2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção 1. 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003. Aprovar as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella*

Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Seção 1, p. 03, 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 10 de 11 de abril de 2013. Definir o programa de gestão de risco diferenciado, baseado em vigilância epidemiológica e adoção de vacinas, para os estabelecimentos avícolas considerados de maior susceptibilidade à introdução e disseminação de agentes patogênicos no plantel avícola nacional e para estabelecimentos avícolas que exerçam atividades que necessitam de maior rigor sanitário. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Seção 1, 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N°56 de 04 de dezembro de 2007. Procedimentos para registro, fiscalização e controle de estabelecimentos avícolas de reprodução e comerciais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Seção 1, 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 44 de 23 de agosto de 2001. Aprova as Normas Técnicas para o Controle e a Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas para a Micoplasmose Aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *synoviae* e *melleagridis*). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Seção 1, p.68, 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria N° 210 de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Seção 1, p.226, 1998.

BRASIL, Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. <http://www.mdic.gov.br/comercio-exterior/estatisticas-de-comercioexterior/balanca-comercial-brasileira-acumulado-do-ano> Acessado em 23/12/2017

BRASIL, Ministério da Saúde, Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde – DATASUS, 2014.

BRASIL, Relação de matadouros registrados no Serviço de Inspeção Federal http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?sigisif_cons&estabelecimentos.rdf&p_id_area=1&p_id_cat_estab=73&p_id_classe_estab=&p_cd_classe_estab=&p_sg_uf=&p_id_municipio=&p_serial=1034863499¶mform=no. Acessado em 20/01/2018

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. Brasília. v.1, p. 8, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria N° 542. Normas de Higiene e Segurança Sanitária para Habilitação de Estabelecimentos Avícolas de Criação de Aves e Incubatórios Avícolas para o Intercâmbio no MERCOSUL. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF 1998.

BRAYAN, A., SHAPIR, N.; SADOWSKY, M. J. Frequency and distribution of Tetracycline resistance in genetically diverse, no selected and no clinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal source. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 4, p. 2503-7, 2004.

CASTRO, A. G. M. Importância do Intercâmbio Técnico entre o Setor Público e Privado em prol do Desenvolvimento da Avicultura. In: XI Simpósio Brasil Sul de Avicultura e II Brasil Sul Poultry Fair. Anais Chapecó - Brasil, p.12-17, 2010.

CENTER FOR DISEASE DYNAMICS, ECONOMICS & POLICY (CDDEP). State of the world's antibiotics. Washington DC, 2015.

CHASETOPPING, M. E.; ROSSER T.; ALLISON L. J.; COURCIER E.; EVANS J.; MCKENDRICK I. J.; PEARCE M. C.; HANDEL I.; CAPRIOLI A.; KARCH H.; HANSON M. F.; POLLOCK K. G. J.; LOCKING M. E.; WOOLHOUSE M. E. J.; MATTHEWS L.; LOW J. C.; GALLY D. L. Pathogenic potential to humans of bovine *Escherichia coli* O26, Scotland. Emerging Infectious Diseases, v.18, n.3, p.439-448, 2012.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis. J. Clin. Microbiol., v. 42, p. 1770–1772, 2004.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ. Microbiol. Rep., v. 5, p. 58–65, 2013.

CLERMONT, O.; LESCAT, M.; O'BRIEN, C. L.; GORDON, D. M.; TENAILLON, O.; DENAMUR, E. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. Environ. Microbiol., v. 10, p. 1000–1006, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3th, M31-A3. CLSI, Wayne, PA., 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. M100- S24. CLSI, Wayne, PA., 2014.

CLINICAL & LABORATORY STANDART INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 27th Edition 2017.

COHN, L. A. & MIDDLETON, J. R. A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), v. 20, p. 31–45, 2010.

COOKSON, L. B. T.; VANDAMME, P.; CARLSON, L. C.; LARSON, A. M.; SHEFFIELD J. V. L.; KERSTERS, K.; SPACH, D. H. Bacteremia Caused by a Novel *Bordetella* Species, "*B. hinzii*". Journal of Clinical Microbiology, v. 32, p. 2569-2571, 1994.

CORRAND, L.; LUCAS, M. N.; DOUET, J. Y.; ETIENNE, C. L.; ALBARIC, O.; CADEC, A.; GUÉRIN, J. L. A case of unilateral periorbital cellulitis and mandibular osteomyelitis in a turkey flock. Avian Diseases, v.56, p.427–431, 2012.

COSTA, M. C.; BESSEGATTO, J. A.; ALFIERI, A. A.; WEESE, J. S.; FILHO, J. A. B.; OBA, A. Different antibiotic growth promoters induce specific changes in the cecal microbiota membership of broiler chicken. PLoS ONE, v. 12, n. 2, p. e0171642, 2017.

CROXEN, M. A. & FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nature Reviews Microbiology, v.8, p. 26-38, 2010.

- DEVRIESE, L. A.; HERMANS, K.; BAELE, M.; HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. Vet. Microbiol., v. 133, p. 206–207, 2008.
- DIERIKX, C.; GOOT, J. V. D.; FABRI, T.; ZANDBERGEN, A. V. E.; SMITH, H.; MEVIUS D. 1,3Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. Journal Antimicrobial Chemotherapy v.68 p.60–67, 2013.
- EL-SAYED, A.; ALBER, J.; LAMMER, C.; JAGER, S.; WOLTER, W.; VÁZQUEZ, H.C. Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico. Vet. Méx., v.37, n.2, p.165-179, 2006.
- FERNANDES, M. R.; SELLERA, F. P.; ESPOSITO, F.; SABINO, C. P.; CERDEIRA, L.; LINCOPAN, N. Colistin-resistant *mcr-1* -positive *Escherichia coli* on public beaches, an infectious threat emerging in recreational waters. Antimicrob. Agents Chemother, *in press*, 2017.
- FERNANDES, M. R.; MOURA, Q.; SARTORI, L.; SILVA, K. C.; CUNHA, M. P.; ESPOSITO, F.; LOPES, R.; OTUTUMI, L. K.; GONCALVES, D. D.; DROPA, M.; MATTE, M. H.; MONTE, D. F.; LANDGRAF, M.; FRANCISCO, G. R.; BUENO, M. F.; DE OLIVEIRA GARCIA D, KNOBL, T.; MORENO, A. M.; LINCOPAN, N. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. Euro Surveill., v. 21, n. 17, p. 1-6, 2016.
- FERREIRA, A.J.P.; FERREIRA C.S.A. Doenças das aves. p. 209- 211, 2003.
- FERREIRA, T. Z.; SESTERHENN, R.; KINDLEIN, L. Economic Losses of Main Causes of Condemnation of Broiler Carcass in a Slaughterhouse under Federal Inspection on Rio Grande do Sul, Brazil. Ciência animal brasileira., v.17, n.1, p. 79-89, 2016.
- FERREIRA, T. Z.; SESTERHENN, R.; KINDLEIN, L. Economic Losses of Main Causes of Condemnation of the Broiler Carcass in a Slaughterhouse under Federal Inspection on Rio Grande do Sul, Brazil. Acta Sci Vet., v. 40, n. 1, p. 1021-14, 2012.
- FERREIRA, A.J.P.; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI JR., A; SILVA, E.N., DI FABIO, J.; SEST, L.; ZUANAZE, M.A. Doenças das Aves, 2ª. Ed.Campinas: FACTA, p. 1102, 2009.
- FORSYTHE, S. J. Microbiologia da Segurança de Alimentos. 2º ed. ARTMED EDITORA LTDA., p.221-232, 2013.
- FRANCO, R. M. *Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana. 144 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal Fluminense, 2002.
- FRY, N. K.; DUNCAN, J.; EDWARDS, M. T.; TILLEY, R. E.; CHITNAVIS, D.; HARMAN, R.; HAYDN HAMMERTON AND LINDA DAINTON A. UK clinical isolate of *Bordetella hinzii* from a patient with myelodysplastic syndrome. Journal of Medical Microbiology, v. 56, p. 1700–1703, 2007.

- FUKAYAMA, E. H.; BERTECHINI, A. G.; GERALDO, A.; KATO, R. K.; MURGAS, L. D. S. Extrato de Orégano como Aditivo em Rações para Frangos de Corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 34, n. 6, p. 2316-2326, 2005.
- FUNKE, G.; HESS, T.; GRAEVENITZ, A. V.; VANDAMME, O. Characteristics of *Bordetella hinzii* Strains Isolated from a Cystic Fibrosis Patient over a 3-Year Period. *Journal of clinical microbiology*. v. 34, p. 966-969, 1996.
- GADEA, I.; CUENCA-ESTRELA, M.; BENITO, N.; BLANCO, A.; FERNÁNDEZ-GUERRERO, M. L.; VALERO-GUILLÉN, P. L.; SORIANO, F. *Bordetella hinzii*, a “new” opportunistic pathogen to think about. *J Infect*, v. 40, p. 298–299, 2000.
- GAO, Q.; WANG, X.; XU, H.; XU, Y.; LING, J.; ZHANG, D.; GAO, S.; LIU, X. Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. *Veterinary Microbiol.* v.12 n.143, 2012.
- GHUNAIM, H.; ABDU-MADI, M. A.; KARIYAWASAM, S. Advances in vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli* respiratory disease: potentials and limitations. *Vet. Microbiol.* v. 172, p. 13–22, 2014.
- GUILVOUT, I.; CARNIEL, E.; PUGSLEY, A. P. Yersinia spp. HMWP2, a cytosolic protein with a cryptic internal signal sequence which can promote alkaline phosphatase export. *Journal of Bacteriology*, v.177, p.1780–1787, 1995.
- HACHESOO, B. A.; ASASI, K.; SHARIFIYAZDI, H. Farm-level evaluation of enrofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolated from broiler chickens during a rearing period. Springer-Verlag, v. 26, n.2, p. 471-476, 2017.
- HALL, R. M. & COLLIS, C. M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol.*, v. 15, p. 593–600, 1995.
- HANCOCK, V.; FERRITERES, L.; KLEMM, P. The ferric yersiniabactin uptake receptor *FyuA* is required for efficient biofilm formation by urinary tract infection *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology.*, v. 154, p. 167–175, 2008.
- HANSSSEN, A. M. & ERICSON SOLLID, J. U. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 46, p. 8–20, 2006.
- HAVERI, M.; HOVINEN, M.; ROSLOF, A.; PYORALA, S. Molecular Types and Genetic Profiles of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Intramammary Infections and Extramammary Sites. *Journal of clinical microbiology*, v.46, n.11, p. 3728–3735, 2008.
- HEBA, S.; MOHAMED, K. H. F.; ESSAM, H. M.; NASEF, S. A. Using Integral System Staphilococchi Kit for Biochemical Identification and Susceptibility Testing of Coagulase Negative *Staphylococcus* Isolated from Broiler Chickens in Egypt. *Global Veterinaria*, v. 13, n. 6, p. 1022-1028, 2014.
- HEUVELINK, A. E.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M.; VAN DEN BIGGELAAR, F. L. A. M.; VAN LEEUWEN, W. J.; DE BOER, E. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *International Journal of Food Microbiology*, v.52, n.1-2, p.67-75, 1999.

HOUSDEN, N. G. & KLEANTHOS, C. Colicin translocation across the *Escherichia coli* outer membrane. *Biochem. Soc. Trans.* v. 40, p. 1475–1479, 2012.

HUBER, H.; ZIEGLER, D.; PFLUGER, V. Prevalence and characteristics of methicillin resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. *BMC Vet Res*, v.7, p. 6, 2011.

HUIJBERS, P. M.; VAN HOEK, A. H.; GRAAT, E. A.; HAENEN, A. P.; FLORIJN, A.; HENGEVELD, P. D.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and extended-spectrum and AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and in people living and/or working on organic broiler farms. *Vet. Microbiol.* v. 176, n. 1-2, p. 120-5, 2015.

HUJA, S., OREN, Y.; BIRAN, D.; MEYER, S.; DOBRINDT, U.; BERNHARD, J.; BECHER, D.; HECKER, M.; SOREK, R.; RON, E. Z. Fur is the master regulator of the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* response to serum. *MBio*, v. 5, p. 1–12, 2014.

HUJA, S.; OREN, Y.; TROST, E.; BRZUSZKIEWICZ, E.; BIRAN, D.; BLOM, J.; GOESMANN, A.; GOTTSCHALK, G. HACKER, J.; RON, E. Z.; DOBRINDT, U. Genomic avenue to avian colisepticemia. *MBio*, v. 6, p. 1–13, 2015.

HUYNH, M.; CARNACCINI, S.; DRIGGERS, T.; SHIVAPRASAD, H. L. Ulcerative dermatitis and valvular endocarditis associated with *Staphylococcus aureus* in a hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*). *Avian Diseases*, v. 58, p. 223-227, 2014.

IBADIN, E. E. & ENABULELE, I. O.; MUINAH, F. Prevalence of *mecA* gene among staphylococci from clinical samples of a tertiary hospital in Benin City, Nigeria. *Afri Health Sci.*, v. 17, n. 4, p. 1000-1010, 2017.

IBGE <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/2013-agencia-de-noticias/releases/9439-pib-recua-3-6-em-2016-e-fecha-ano-em-r-6-3-trilhoes.html>

IBGE, 2016 <https://cidades.ibge.gov.br/painel/historico.php?codmun=330515>
<https://cidades.ibge.gov.br/painel/economia.php?lang=&codmun=330515&search=rio-de-janeiro|sao-jose-do-vale-do-rio-preto|infogr%E1ficos:-despesas-e-receitas-or%E7ament%E1rias-e-pib> acessado em 04/01/2018

IBGE, PNAD, <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2014/> acessado em 06/06/2017.

ITO, T. & HIRAMATSU, K. Acquisition of methicillin resistance and progression of multi-antibiotic resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Med J*, v. 39, p. 526–33, 1998.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASDA, K.; MORI, N.; TSUTSUMIMOTO, K.; TIENSASITORN, C.; HIRAMATSU, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *S. aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 1323-1336, 2001.

JACKWOOD, M. W.; MCCARTER, S. M.; BROWN, T. P. *Bordetella avium*: an opportunistic pathogen in Leghorn chickens. *Avian Dis.*, v. 39, p. 360–367, 1995.

- JANBEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.*, v. 291, p. 371–378, 2001.
- JEONG, Y. W.; KIM, T. E.; KIM, J. H.; KWON, H. J. Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. *J. Vet. Sci.*, v. 13, p. 145–152, 2012.
- JIIYIPONG, T.; MORAND, S.; JITTAPALAPONG, S.; RAOULT, D.; ROLAIN, J. M.; *Bordetella hinzii* in rodents, Southeast Asia. *Emerg Infect Dis.*, v. 19, p. 502–503, 2013.
- JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y. M.; JOHNSON, S. J.; NOLAN, L. K. Complete DNA Sequence, Comparative Genomics, and Prevalence of an IncHI2 Plasmid Occurring among Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 50, n. 11, p. 3929–3933, 2006.
- JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y. M.; JOHNSON, S. J.; LOGUE, C. M.; WHITE, D. G.; DOETKOTT, C.; NOLAN, L. K. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 73, n. 6, p. 1976–1983, 2007.
- JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S. C.; NOLAN, L. K. Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *Journal of clinical microbiology*, v. 46, n. 12, p. 3987–3996, 2008.
- JOHNSON, J. R.; & STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* 9 strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* v. 181, p. 261–272. 2000.
- JONES, F. T. & RICKE, S. C. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poultry Science*, v. 82, p.613–617, 2003.
- KANE, D. J.; SARAFIAN, T. A.; ANTON, R.; HAHN, H.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S.; BREDESEN, D. E. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, v. 262, p. 1274–1277, 1993.
- KARIYAWASAM, S.; SCACCIANOCE, J. A.; NOLAN, L. K. Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. *BMC Microbiology*, v. 7, n. 81, p. 1–8, 2007.
- KATTAR, M. M.; CHAVEZ, J. F.; LIMAYE, A. P.; RASSOULIAN-BARRETT, S. L.; YARFITZ, S. L.; CARLSON, L. C. Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. *J Clin Microbiol.* v. 38, p. 789–94, 2000.
- KITAI, S.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; SATO, E.; NAKANO C, UJI T; Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. *Journal Veterinary Medicine Science* v.67 p.107, 2005.
- KONEMAN, W. E.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, JR.W.C. In: KONEMAN, E. W. Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2012.

- KOGA, V. L.; RODRIGUES, G. R.; SCANDORIEIRO, S.; VESPERO, E. C.; OBA, A.; BRITO, B. G.; BRITO, K. C. T.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T. Evaluation of the Antibiotic Resistance and Virulence of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Carcasses in 2007 and 2013 from Parana, Brazil. *Foodborne pathogens and disease*, v. 12, n. 6, p. 479-85, 2015.
- KUMARASAMY, K. K.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, v. 10, p. 597–602, 2010.
- KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H. I.; KOBAYASHI, L.; CUI, A.; OGUCHI, K.; AOKI, Y.; NAGAI, J. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New Engl. J. Med.*, v. 319, p. 157-61, 2001.
- LARTIGUE, M. F. R.; POIREL, L.; FORTINEAU, N.; NORDMANN, P. Chromosome-Borne Class A BOR-1 -Lactamase of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v.49, n. 6, p. 2565–2567, 2005.
- LESCAT, M.; CLERMONT, O.; WOERTHER, P. L.; GLODT, J.; DION, S.; SKURNIK, D. Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure. *Environ. Microbiol. Rep.*, v. 5, p. 49–57. 2013.
- LEE, J. H. Methicillin (Oxacillin)-resistant *S. aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p. 6489-6494. 2003.
- LEE, J. H. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. *Veterinary Microbiology* v.114, p.155–9. 2003.
- LEONARD, F. C. & MARKEY, B. K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Veterinarian Journal*, v. 175, n. 1, p. 27-36, 2008.
- LEVESQUE, C. & ROY, P. H. PCR analysis of integrons. In: *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, p. 590– 594. 1993.
- LI, Q.; SHERWOOD, J. S.; LOGUE, C. M. Characterization of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from processed bison carcasses. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, n. 6, p. 2361-9, 2007.
- LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L. F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, L.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Infect Dis*, v. 16, n. 2, p. 161-8, 2015.
- LOONG, S. K.; HIDAYANA, N.; WALI, H. A. M.; TALIB, S. A. A.; NASRAH, S. N. A.; WONG, P. I. F.; ABUBAKAR, S. Molecular and antimicrobial analyses of non-classical *Bordetella* isolated from a laboratory mouse Laboratory. *Animal Science*, v. 78, n. 4, p. 715-7, 2016.
- LOPÉZ, H. S. & OLVERA, L. G. Problemática del uso de enrofloxacin en la avicultura en México. *Vet. Méx.*, v. 31, n. 2, p. 137-145, 2000.

- LÓPEZ-SAUCEDO, C.; JORGE F. CERNA, J. F.; VILLEGAS-SEPULVEDA, N.; THOMPSON, R.; VELAZQUEZ, F. R.; TORRES, J.; TARR, P. I.; GARCÍA, T. E. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction To Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.*, v. 9, n. 1, p. 127-31, 2003.
- MELO, D. A.; COELHO, I. S.; MOTTA, C. C.; ROJAS, A. C. C. M.; DUBENCZUK, F. C.; COELHO, S. M. O.; SOUZA, M. M. S. Impairments of *mecA* gene detection in bovine *Staphylococcus* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 3, pp. 1075-1082, 2014.
- MENDONÇA, E. C. L. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp isolados de mastites clínicas e subclínicas em unidades leiteiras de municípios do Rio de Janeiro como subsídio para implementação de medidas de controle. 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2012.
- MESA, R. J.; BLANC, V.; BLANCH, A. R. Extended-spectrum b-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v.58: n.211, p.5, 2006.
- MILES, T. D.; MCLAUGHLIN, W.; BROWN, P. D. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chicken and humans. *BMC Veterinary Research*. p. 2:7 2006.
- MINISTRY OF AGRICULTURE AND FORESTRY (MAF) (New Zealand). – Import risk analysis: chicken meat and chicken meat products; Bernard Matthews Foods Ltd turkey meat preparations from the United Kingdom. MAF Regulatory Authority, Wellington, New Zealand. Available at: mpi.govt.nz/document-vault/2816. 1999.(acessado em 10/08/2016).
- MALUTA, R. P.; NICHOLSON, B.; LOGUE, C. M.; NOLAN, L. K.; ROJAS, T. C. G.; DIAS DA SILVEIRA, W. Complete genomic sequence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain of serotype O7:HNT. *Genome Announc*, v. 4, n. 1, p. e01611-15, 2016.
- MUNOZ-PRICE, L. S.; POIREL, L.; BONOMO, R. A. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*, v. 13, p. 785–96, 2013.
- MURAKAMI, K.W.; MINAMIDE, K.; WADA, W.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANBE, S. Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 10, p. 2240-2244, 1991.
- MURRAY, P.R; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. Elsevier editora 6^a edição, p. 179-183, 2010.
- NATARO, J. P. & KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 11, p. 142-201, 1998.
- NAKAZATO, G.; CAMPOS, T. A.; STEHLING, E. G.; BROCCHI M.; SILVEIRA, W. D. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.7, p.479-486, 2009.
- NEMEGHAIRE, S.; VANDERHAEGHEN, W.; ARGUDIN, M. A.; HAESEBROUCK, F.; BUTAYE, P. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* isolates from industrially raised pigs, cattle and broiler chickens. *J Antimicrob Chemother*, v. 69, n. 11, p.2928-34, 2014.

NGUYEN, N. T.; NGUYEN, H. M.; NGUYEN, C. V.; NGUYEN, T. V.; NGUYEN, M. T.; THAI, H. Q.; HO, M. H.; THWAITES, G.; NGO, H. T.; BAKER, S.; CARRIQUE-MAS, J. Use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and its association with resistance in commensal *Escherichia coli* bacteria. *Appl Environ Microbiol.*, v. 82, n. 13, p. 3727-373, 2016.

NORDMANN, P.; JAYOL, A.; POIREL, L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, v. 22, n 6, p, 1038-43 2016.

ODUGBO, M. O.; MUSA, U. S. O.; EKUNDAYO, P. A.; OKEWOLE; J.ESILONU. *Bordetella avium* infection in chickens and quail in Nigeria: preliminary investigations. *Vet. Res. Commun.*, v. 30, n. 1, p. 1–5. 2006.

OHARA-NEMOTO, Y.; HARAGA, H.; KIMURA, S.; NEMOTO, T. K. Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal– oral trafficking of the bacteria. *J Med Microbiol.*, v. 57, p. 95-9, 2008.

OLIVEIRA, A. A.; ANDRADE, M. A.; ARMEDARIS, P. M.; BUENO, P. H. S. Principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal entre 2006 e 2011. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.17, n.1, p. 79-89 jan./mar. 2016.

OTERO, R. M.; VASZQUEZ, M. A. M.; LOPEZ, D.; NORIEGA. E. R.; GONZÁLEZ, E. G. Isolation of Rare Coagulase-Negative Isolates in Immunocompromised Patients: *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus pettenkoferi* and *Staphylococcus pasteurii*. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, v. 42, n 2, p. 182-5, 2012.

OTTO, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol*, v. 34, p. 201–14, 2012.

PAIXÃO, A. C.; FERREIRA, A. C.; FONTES, M.; THEMUDO, P.; ALBUQUERQUE, T.; SOARES, M. C.; FEVEREIRO, M.; MARTINS, L.; CORRÊA, M. L. Detection of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates. *Poultry Science* v. 0, p. 1–7, 2016.

PERSOONS, D.; HOOREBEKE, S. V.; HERMANS, K.; BUTAYE, P.; KRUIF, A.; HAESBROUCK, F.; DEWULF, J. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Poultry *Emerging Infectious Diseases.*, v, 15, n. 3, p. 452-453, 2009.

PILIPCINEC, E. L.; TKACIKOVA, H. T.; NAAS, R.; CABADAJ; I. MIKULA. Isolation of verotoxigenic. *Escherichia coli* O157 from poultry. *Folia Microbiologica*, v. 44, p.455-456, 1999.

PIRS, M.; RING, T.; SEME, K.; HERGOUTH, V. H.; KIŠEK, T. C. Screening for colistin resistance during antimicrobial susceptibility testing -usefulness of SuperPolymyxin agar. *27^oECCMID Vienna*, 2017.

PLOY, MA. C.; LAMBERT, T.; COUTY, J. P.; FRANÇOIS, D. Integrons: an Antibiotic Resistance Gene Capture and Expression System. *Clinical chemistry and laboratory medicine.*, v. 38, n. 6, p. 483-7, 2000.

RAHIMI, F.; BOUZARI, M.; MALEKI, Z.; RAHIMI, F. Antibiotic susceptibility pattern among *Staphylococcus* spp. with emphasis on detection of *mecA* gene in methicillin resistant

Staphylococcus aureus isolates. Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases, v. 4, n. 3, p. 143-150, 2009.

REGISTER, K. B.; IVANOV, Y. V.; HARVILL, E. T.; BRINKAC, L.; KIM, M.; LOSADAC, L. Draft Genome Sequences of Six *Bordetella hinzii* Isolates Acquired from Avian and Mammalian Hosts. Journal ASM. v. 3, n. 2, p. e00081-15, 2015

REGISTER, K. B.; KUNKLE, R. A. Strain-Specific Virulence of *Bordetella hinzii* in Poultry. Avian Diseases. v.53, p. 50–54, 2009.

RECCHIA, G. D. & HALL, R. M. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. Trends Microbiol. v. 5, p. 389–394, 1997.

ROBERTS, M. C. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. FEMS Microbiology Letters, v. 282, p. 147–59, 2008.

ROBERTS, M. C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. FEMS Microbiology Reviews, v. 19, p. 1–24. 1996.

ROCHA, S. L. S.; FURIAN, T. Q.; BORGES, K. A.; ROCHA, D. T.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V. P. Classification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) and Human Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in Phylogenetic Groups and Association with Pathogenicity *In Vivo*. Acta Scientiae Veterinariae, v. 45, p. 1466, 2017.

ROGERS, K. L.; FEY, P. D.; RUPP, M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections. Infect Dis Clin North Am, v. 23, n. 1, p. 73-98, 2009.

ROSATO, A. E.; KREISWIRTH, B. N.; GRAIG, W. A.; EISNER, W.; CLIMO, M. W.; AECHER, G. L. *mecA-BlaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v.47, n. 4, p. 1463-1466, 2003.

RUIZ, P.; MARTINE, M. P. V; CALLEJA, L. A. I. Respiratory infection caused by *Bordetella hinzii*. Arch. Bronconeumol., v. 49, n.9, p. 369-412, 2013.

RUMIŃSKA, E.; & KONCICKI, A. Bordetelloza indyków. Med Weter, v. 55, p. 723-727, 1999.

SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J.R.; MCDOUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. Diseases of Poultry. 12th ed, Blackwell Publishing, p. 774-784. 2008.

SALLES, M. J. C.; ZURITA, J.; MEJIÁ, C.; VILLEGAS, M. V. Resistant Gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. Epidemiol Infect. V. 141, n. 12, p. 2459-72, 2013.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive Staphylococci. Journal of Clinical Microbiology, v. 48, n. 3, p. 765–769, 2010.

SCHOENFELDER, S. M. K.; DONG, Y.; FEßLER, A. T.; SCHWARZ, S.; SCHOENC, C.; KÖCKD, R.; ZIEBUHR, W. Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. *Veterinary Microbiology*, v. 200, p. 79-87, 2016.

SHARMA, P. C.; JAIN, A.; JAIN, S. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, v. 66, n. 6, p. 587-604, 2009.

SISTEMA DE INTEGRAÇÃO AGROPECUÁRIA (SIAPEC-RJ)
<http://www.rj.gov.br/web/seapec/exibeconteudo?article-id=420878> acessado em 20/01/2018

SOARES, L.C. Correlação entre marcadores fenotípicos e genotípicos de virulência e resitência a oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados a partir de mastite bovina. 2010. 82p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2010.

SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, n. 2, p. 625-30, 1996.

STEPIEŃ-PYŚNIAK, D.; WILCZYŃSKI, J.; MAREK, A.; ŚMIECH, A.; KOSIKOWSKA, U.; HAUSCHILD, T.; *Staphylococcus simulans* associated with endocarditis in broiler chickens. *Avian Pathology*. v. 46, n. 1, p. 44-51, 2016.

TAPONEN, S.; SUPRE, K.; PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; DE VliegHER, S., KOORT, J. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine sub-clinical and mild clinical mastitis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 61-65, 2012.

TIBRA, N. K.; JALALI, S.; REDDY, A. K.; NARAYANAN, R.; AGARWAL, R. Traumatic endophthalmitis caused by *Staphylococcus gallinarum*. *J Med Microbiol.*, v. 59, p. 365-366, 2010.

TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4a. Ed. Sao Paulo: Atheneu, p. 718, 2005.

UNAL, N.; AŞKAR, S.; YILDIRIM, M. Antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from broiler cloacal samples. *Turk J Vet Anim Sci*, v. 42, n. 2, 199-203, 2017.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF), Agencia Brasileira de promoção de exportações e investimentos. A saga da aviculture brasileira; Como o Brasil se tornou o maior exportador mundial de carne de frango, p. 15-39, 2011.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF), 2011.
<http://www.brazilianchicken.com.br/home/nossahistoria> acessado em 27/07/2017.

UNITED STATES OF DEPARTAMENT AGRICULTURE (USDA) Livestock and Poultry: World Markets and Trade. p. 20, 2017.

UZAL, F. A.; CHURRIA, C. D. G.; CRISPO, M.; SHIVAPRASAD, H. L. Gangrenous dermatitis in chickens and turkeys. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, v. 30, n. 2, p. 188-196, 2017.

VON KÖNIG CHW, MANN MR, COENYE T. VERLASOVIC J, CARROLL KC, FUNKE G, JORGENSEN JH, LANDRY ML, WARNOCK DW *Bordetella* and related genera. *Manual of clinical microbiology*, ASM Press; v. 1, p. 739–50, 2011.

YANG, D.; QIU, Z.; SHEN, Z.; ZHAO, H.; JIN, M.; LI, H.; LIU, W.; LI, J. W. The occurrence of the colistin resistance gene *mcr-1* in the Haihe River (China). *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 14, n. 6, p. E576, 2017.

YIN, W.; LI, H.; SHEN, Y.; LIU, Z.; WANG, S.; SHEN, Z.; ZHANG, R.; WALSH, T. R.; SHEN, J.; WANG, Y. NOVEL Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio*, v. 8, n. 3, p. e00543, 2017.

YU, D.; CHEN, Y.; PAN, Y.; LI, H.; MCCORMAC, M. A.; TANG, Y. W. Case report: *Staphylococcus gallinarum* bacteremia in a patient with chronic hepatitis B virus infection. *Ann Clin Lab Sci*, v. 38, n. 4, p. 401-4, 2008.

ZHANG, K.; SPARLING, J.; CHOW, B.L.; ELSAYED, S.; HUSSAIN, Z.; CHURCH, D.L.; GREGSON, D.B.; LOUIE, T.; CONLY, J.M. New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 11, p. 4947–4955, 2004.

7. ANEXOS

Anexo I. Aditivos melhoradores de desempenho liberados para o uso em animais de produção.

| Aditivos melhoradores de desempenho liberados para uso em animais de produção | | |
|---|----------------|---------------------------|
| AVILAMICINA | LINCOMICINA | MADURAMICINA AMÔNIO |
| BACITRACINA METILENO DISALICILATO | MONENSINA | MADURAMICINA+ NICARBAZINA |
| BACITRACINA DE ZINCO | NARASINA | MONENSINA |
| COLISTINA | SALINOMICINA | MONENSINA + NICARBAZINA |
| ENRAMICINA | TIAMULINA | NARASINA |
| FLAVOMICINA | TILOSINA | ROBENIDINA |
| HALQUINOL | VIRGINIAMICINA | CLOREXIDINA |
| LASALOCIDA | ZILPATEROL | RACTOPAMINA |

Anexo II. Certificado de aprovação no Comissão de Ética no Uso de Animais.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Utilização de técnicas moleculares e proteômicas na otimização do diagnóstico, na análise do perfil de toxinas e da resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. e enterobactérias oriundos de ambientes de produção animal", protocolada sob o CEUA nº 3664040915, sob a responsabilidade de **Miliane Moreira Soares de Souza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 16/10/2015.

We certify that the proposal "Use of molecular and proteomic techniques in the diagnosis improvement, toxin profile analysis and antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. and enterobacteria from animal production environment ", utilizing 100 Bovines (100 females), 100 Birds (100 males), protocol number CEUA 3664040915, under the responsibility of **Miliane Moreira Soares de Souza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 10/16/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **10/2015** a **08/2016**

Área: **Microbiologia E Imunologia Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 6 anos**

N: **100**

Linhagem: **Leiteira**

Peso: **180 a 250 kg**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos**

idade: **30 a 40 dias**

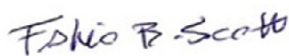
N: **100**

Linhagem: **corte**

Peso: **3 a 5 kg**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados na fazenda leiteira situada na cidade de Barra do Pirá e em dois aviários industriais e orgânicos situados no Estado do Rio de Janeiro.

Seropédica, 26 de dezembro de 2017



Prof. Dr. Fabio Barbour Scott

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**
Instituto de Veterinária



Seropédica, 20 de dezembro de 2016
CEUA N 3664040915

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Miliane Moreira Soares De Souza
Área: Microbiologia E Imunologia Veterinária

Título da proposta: "Utilização de técnicas moleculares e proteômicas na otimização do diagnóstico, na análise do perfil de toxinas e da resistência antimicrobiana de Staphylococcus spp. e enterobactérias oriundos de ambientes de produção animal".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFRRJ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Parcial (versão de 16/novembro/2016) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Qual o estágio do estudo no momento? Resp: Foram finalizadas as etapas de coleta das amostras, isolamento e identificação das espécies bacterianas, e será iniciada a análise de fatores de virulência 2. Qual o N amostral alocado até o momento? Resp: 120 "swabs de traqueia e cloaca de aves com idade média de 33 dias. foram avaliadas 500 amostras de leite de vacas positivas ao teste CMT 3. Por quanto tempo mais o estudo se estenderá? Resp: ao longo de 2017 4. Resultados parciais ou totais apresentados em congresso? Resp: sim 1. MOTTA, C. C.; COELHO, Shana de Mattos de Oliveira; SOUZA, M.M.S. DE Avaliação Proteômica na Identificação de Staphylococcus spp isolados do leite e sua cadeia produtiva In: X Fórum da Pós-graduação da UFRRJ, 2015, Seropédica. Anais do X Fórum da Pós-Graduação da UFRRJ. , 2015. 4. MARQUES, V. F.; COELHO, Shana de Mattos de Oliveira; SOUZA, M.M.S. DE Estudo da Produção de Biofilme e Resistência aos Beta-lactâmicos em Staphylococcus aureus isolados de mastite bovina In: X Fórum da Pós-graduação da UFRRJ, 2015, Seropédica. Anais do X Fórum da Pós-Graduação da UFRRJ. , 2015. 5. SILVA, M. T.; MOTTA, C. C.; ROJAS, A. C. C. M.; SOUZA, M.M.S. DE Implantação de novas metodologias na caracterização genotípica de Staphylococcus spp isolados a partir de ambiente de produção leiteira In: III Reunião Anual de Iniciação Científica, 2015, Seropédica. Anais da III Reunião Anual de Iniciação Científica. , 2015. 7. Rodrigues, N.M.B.; SOUZA, M.M.S. DE; COELHO, Shana de Mattos de Oliveira Utilização da técnica de MALDI-TOF MS para identificação de enterobactérias associadas à mastite bovina In: X Fórum da Pós-graduação da UFRRJ, 2015, Seropédica. anais do X Fórum da Pós-Graduação da UFRRJ. , 2015. 9. PIMENTA, R. L.; SOUZA, M.M.S. DE Caracterização Fenogenotípica de Staphylococcus spp associada a análise do perfil de produção de enterotoxinas e resistência antimicrobiana em ambientes de produção avícola e seus respectivos impactos sobre a produtividade In: XIX Fórum da Pós-graduação da UFRRJ, 2014, Seropédica. anais do XIX Fórum da Pós-Graduação da UFRRJ. , 2014. 5. Resultados parciais ou totais já publicados? Resp: sim 1. Rodrigues, N.M.B.; ALMEIDA, G. F. B.; Santiago, G. S.; Botelho, L. A. B; Moreira, B. M.; Coelho, I. S.; Souza, M. M. S.; COELHO, Shana de Mattos de Oliveira MALDI-ToF MS identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. Brazilian Journal of Microbiology (Impresso), 2016. "

Comentário da CEUA: ""

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro