UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

FERNANDA BORGES BARBOSA

**Pesquisa de genes de resistência aos compostos de
amônia quaternária (QAC) em estirpes de *Escherichia coli*
isoladas de aves comerciais**

São Paulo
2020

FERNANDA BORGES BARBOSA

**Pesquisa de genes de resistência aos compostos de
amônia quaternária (QAC) em estirpes de *Escherichia coli*
isoladas de aves comerciais**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Patologia Experimental e Comparada
da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Departamento:

Departamento de Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Terezinha Knöbl

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4021
FMVZ

Barbosa, Fernanda Borges

Pesquisa de genes de resistência aos compostos de amônia quaternária (QAC) em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de aves comerciais / Fernanda Borges Barbosa. – 2020.

42 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha Knöbl.

1. Avicultura. 2. Colibacilose. 3. PCR. 4. *qacE*. 5. *sugE*. I. Título.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 30th September 2020

CERTIFIED

We certify that the Research "Desinfectant resistance profile in isolates of enterobacteria and Pseudomonas aeruginosa isolated from commercial birds", protocol number CEUAX 3328060320 (ID 001544), under the responsibility Terezinha Knöbl, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day August 12, 2020.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Perfil de resistência a desinfetantes em isolados de enterobactérias e Pseudomonas aeruginosa isoladas de aves comerciais", protocolado sob o CEUAX nº 3328060320, sob a responsabilidade de Terezinha Knöbl, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 12 de agosto de 2020.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BARBOSA, Fernanda Borges

Título: Pesquisa de genes de resistência aos compostos de amônia quaternária (QAC) em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de aves comerciais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos por meus pais e minha irmã, que sempre primaram pela minha educação. Obrigada Bartolomeu, Sandra e Vanessa, pelos ensinamentos e força nessa jornada.

Aos meus familiares, especialmente à Jaqueline, Geralda e minha vó por sempre me ajudarem nesse caminho percorrido. Ao meu namorado, Elton, pelos por toda paciência, compreensão, carinho e amor.

À minha orientadora, Terezinha Knöbl, pela atenção, paciência e confiança. Obrigada pelas constantes demonstrações de sabedoria e humildade.

Meus sinceros agradecimentos aos meus colegas do Laboratório de Medicina Aviária, especialmente aos pós-graduandos Letícia, Marcos, Victória, Yamê, Gabriela, Jéssica e Felipe, por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos de graduação que nunca pouparam esforços para me ajudar nesse período, especialmente Juliana, Fábila, Fernanda, Luna, Heloisa, Gabriel, Isabela, Carolina, Nayna, Stefani e Giovanna.

Também agradeço as minhas amigas de longa data, que me apoiaram por todo esse período, especialmente à Rafaela, Amanda, Ana e Camilla.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (Processo: 88887.357195/2019-00).

RESUMO

Barbosa, Fernanda Borges. **Pesquisa de genes de resistência aos compostos de amônia quaternária (QAC) em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de aves comerciais.** [Research of resistance genes to quaternary ammonium compounds (QAC) in poultry] 2020. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Compostos de amônia quaternária (*Quaternary ammonium compounds* – QAC) são bioativos catiônicos surfactantes utilizados como detergentes e desinfetantes, com atividade contra fungos, bactérias Gram positivas, Gram negativas e vírus envelopados. Os desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio (composto de amônia quaternária) são amplamente utilizados na avicultura brasileira. Relatos de resistência a QAC estão cada vez mais frequentes, de forma cosmopolita, sendo relacionados a mutação de genes ou transferência horizontal de elementos genéticos móveis. O objetivo deste trabalho foi analisar a presença de genes de resistência a QAC em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de aves comerciais. Amostras cloacais e clínicas foram coletadas para isolamento de *E. coli*. A pesquisa dos genes *qacE* e *sugE*, codificadores de bombas de efluxo, foi realizada por meio de PCR convencional. Foram analisadas 422 estirpes, 302 de origem cloacal e 120 de origem clínica. Um total de 271 (64,21%) estirpes foram positivas para *qacE* e 180 (42,65%) foram positivas para *sugE*. O gene *qacE* foi detectado em isolados de amostras fecais (62,25%) e clínicas (69,16%). Em menor frequência, foram detectados isolados positivos para *sugE* em isolados fecais (37,41%) e clínicos (55, 83%). Os resultados encontrados confirmam a importância de bombas de efluxo na resistência a QAC e a presença desses genes na cadeia produtiva de aves.

Palavras-chave: Avicultura. Colibacilose. PCR. *qacE*. *sugE*.

ABSTRACT

Barbosa, Fernanda Borges. **Research of resistance genes to quaternary ammonium compounds (QAC) in *Escherichia coli* isolated from poultry.**

[Pesquisa de genes de resistência aos compostos de amônia quaternária (QAC) em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de aves comerciais] 2020. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Quaternary ammonium compounds (QAC) are cationic bioactive surfactants used as detergents and disinfectants, with activity against fungi, Gram positive and negative bacteria and enveloped viruses. Disinfectants based on benzalkonium chloride (quaternary ammonium compound) are widely used in Brazilian aviculture. Reports of QAC resistance are frequent increasing, in a cosmopolitan way, through gene mutation or horizontal transfer of mobile genetic elements. The aim of this study was to analyze the presence of QAC resistance genes in strains of *Escherichia coli* isolated from poultry. Cloacal and clinical samples were collected to isolate *E. coli*. The research for genes *qacE* and *sugE*, encoders of efflux pumps, was carried out by conventional PCR. 422 strains were analyzed, 302 from cloacal samples and 120 from clinical samples. 271 total strains (64.21%) were positive for *qacE* and 180 (42.65%) were positive for *sugE(c)*. The *qacE* gene was detected among fecal isolates (62.25%) and clinical strains (69.16%). In a lower frequency, were detected positive *sugE(c)* strains from fecal samples (37.41%) and clinical samples (55.83%). The results found confirm the importance of efflux pumps in QAC resistance and the presence of these genes in the poultry production.

Keywords: Poultry. Colibacillosis. PCR. *qacE*. *sugE*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFEC – *E. coli* fecais

BHI – *Brain Heart Infusion*

DIF – Departamento de Inspeção Final

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EAEC – *E. coli* enteroagregativa

EHEC – *E. coli* enterohemorrágica

EIEC – *E. coli* enteroinvasora

EPEC – *E. coli* enteropatogênica

ETEC – *E. coli* enterotoxigênica

ExPEC – *E. coli* patogênica extraintestinal

FAO – *Food and Agriculture Organization* – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

LPS - Lipopolissacarídeo

MALDI-TOF-MS – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*

MNEC – *E. coli* associada a meningite neonatal

OIE – *World Organisation for Animal Health* – Organização Mundial da Saúde Animal

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase

PNSA – Programa Nacional de Sanidade Avícola

QAC - *Quaternary ammonium compounds* – Compostos de Amônia Quaternária

SEPEC – *E. coli* associada a sepse

SIF – Serviço de Inspeção Federal

SMR – *Small multidrug resistance proteins*

UPEC – *E. coli* uropatogênica

LISTA FIGURAS

Figura 1. Estrutura química geral de QAC	22
Figura 2. Frequência de ocorrência do gene <i>qacE</i> em isolados de <i>E. coli</i> aviária.	31
Figura 3. Frequência de ocorrência do gene <i>sugE</i> em isolados de <i>E. coli</i> aviária.	31
Figura 4. Frequência de ocorrência dos genes <i>qacE</i> e <i>sugE(c)</i> em isolados de <i>Escherichia coli</i> de origem fecal (AFEC) e clínica (APEC).	32

LISTA TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos isolados de E. coli, conforme origem, estado e ano.....	27
Tabela 2. Lesões observadas em aves condenadas por colibacilose em abatedouro. São Paulo. 2019.	27

LISTA QUADROS

Quadro 1. Principais marcadores de virulência de E. coli patogênicas	17
Quadro 2. Propriedades dos compostos de amônia quaternária-QAC	21
Quadro 3. Descrição dos genes, sequência dos primers, temperatura de anelamento, tamanho de amplicon e referências dos genes utilizados	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. <i>Escherichia coli</i>	15
2.2. COLIBACILOSE.....	18
2.3. PROCESSOS PARA REDUÇÃO DA CARGA MICROBIANA	19
2.4. COMPOSTOS DE AMÔNIA QUATERNÁRIA	20
2.5. RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	22
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. AMOSTRAS.....	26
4.1.1 Isolados fecais de frangos de corte.....	26
4.1.2 Isolados fecais de aves de postura comercial.....	26
4.1.3 Estirpes de APEC	27
4.2. PROCESSAMENTO DAS ESTIRPES BACTERIANAS	28
4.3. PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA QAC PELA PCR.....	29
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a terceira posição no *ranking* mundial de produção de frangos de corte, com 13 milhões de toneladas produzidas em 2019, gerando receita de aproximadamente 7 bilhões de dólares (ABPA, 2020; EMBRAPA, 2020). O estado do Paraná é o maior produtor de frangos de corte do Brasil (32,59%), seguido por Santa Catarina (14,5%) e Rio Grande do Sul (12,44%). O País é o maior exportador do mundo, cerca de 28% da sua produção, equivalente a 13,69 milhões de toneladas de frango, foi destinada à exportação em 2019 (EMBRAPA, 2020). Os principais desafios da cadeia produtiva são: aumento da produtividade com redução de custos, produção sem uso de antimicrobianos, bem-estar-animal e sustentabilidade na produção e controle de barreiras sanitárias (BASSI; SILVA, 2014).

A produção de ovos no Brasil também apresenta grande importância no cenário mundial. O País ocupa a quinta posição na produção mundial, com média anual de 54 bilhões de ovos (TBS REPORT, 2020). Em 2019, 118 milhões de aves de postura foram alojadas e mais de 49 bilhões de ovos foram produzidos, com receita de 10 bilhões de dólares. O estado com maior importância no alojamento de pintainhas é São Paulo (32,97%), seguido por Espírito Santo (10,83%) e Minas Gerais (9,99%) (ABPA, 2020). Os maiores desafios para a indústria são: aumento de custos com insumos, falta de mão de obra qualificada e melhoria da sanidade animal (IEC et al., 2013).

No cenário das doenças bacterianas, os desafios atuais da avicultura estão relacionados ao controle das infecções causadas por Enterobactérias, principalmente *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC). Impactos econômicos devido atraso no desenvolvimento das aves, diminuição de até 70% da produtividade, aumento da mortalidade e condenação de carcaças são prejuízos decorrentes da colibacilose; infecção causada por *Escherichia coli*, e que tem grande importância na cadeia avícola (EWERS et al., 2004; DA ROSA et al., 2019).

Dada a importância da produção de aves comerciais e sanidade de aves de produção, em 1994 foi instituído no Brasil o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que tem como medidas principais a prevenção e controle de enfermidade de interesse em avicultura e Saúde Pública, baseada na vigilância

epidemiológica de doenças avícolas, com a definição de ações que possibilitem a certificação sanitária do plantel avícola nacional e a elaboração de produtos avícolas saudáveis para o mercado interno e externo. As principais doenças avícolas de controle oficial encontradas no PNSA são: influenza aviária, micoplasmose, salmonelose e doença de Newcastle (BRASIL, 2020).

As principais medidas presentes no PNSA são: notificação de suspeitas ou confirmação de doenças de controle obrigatório da Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health* – OIE); adoção de medidas de biossegurança; vigilância epidemiológica e vacinação (BRASIL, 2002). Os programas de biossegurança foram consolidados com a publicação da Instrução Normativa nº 56, que estabelece os procedimentos para registro, fiscalização e controle de estabelecimentos de reprodução e comerciais (BRASIL, 2007). Dentre as normas de biossegurança destacam-se o controle de trânsito de pessoas e animais; descarte correto de resíduos e carcaças; uso de telas em aviários, distanciamento entre propriedades e os procedimentos de limpeza, desinfecção e vazio sanitário (AGEITEC; CARON; JAENISCH, 2020).

Com a proibição do uso de antibióticos como aditivos alimentares houve um aumento da pressão de uso de outras substâncias antimicrobianas, como os desinfetantes, para reduzir a carga microbiana nas criações. Para desinfecção de instalações, os desinfetantes a base de compostos de amônia quaternária (QAC) são os mais frequentemente utilizados, pois possuem um amplo espectro de ação e uma relação custo-benefício favorável. No entanto, os relatos de resistência a desinfetantes estão cada vez mais frequentes (TEZEL; PIERSON; PAVLOSTATHIS, 2007; SALLE; MOARES, 2009). Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi detectar a presença dos genes de resistência a QAC (*qacE* e *sugE(c)*) em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte e aves de postura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo gram-negativo anaeróbio facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é membro da microbiota intestinal de mamíferos e aves (D'ARI; SEZONOV, 2014). É uma das primeiras bactérias a colonizar o trato intestinal após o nascimento, sendo considerada um componente importante da microbiota de animais saudáveis, pois contribui com a secreção de vitaminas e atua na exclusão de patógenos intestinais (TENAILLON et al., 2010). *E. coli* produz diversos fatores de virulência sendo expressos pelas variedades patogênicas, importantes para diferenciação de estirpes comensais e patogênicas (MARTINEZ; TADDEI, 2015).

Apresenta membrana citoplasmática, espaço periplásmico, peptidoglicano e membrana externa contendo lipopolissacarídeo (LPS). A classificação sorológica, é dada de acordo com os antígenos somáticos, sendo a molécula de LPS, flagelo e tipo capsular representados por O, H e K, respectivamente (ORI et al., 2019). Entre os patótipos de *E. coli* os sorotipos mais comuns no Brasil são: O126:H19 (*E. coli* enteropatogênica); O15:H28 e O80:H10 (*E. coli* enteroagregativa típica e atípica); O111:H imóvel (*E. coli* Shigatoxigênica); O6:H16 (*E. coli* enterotoxigênica); e O132:H21 (*E. coli* enteroinvasora) (GOMES et al., 2016). Nas aves, os sorogrupos de maior importância são O78, O2 e O21, embora outros sorogrupos também estejam relacionados aos quadros de colibacilose em frangos de corte, poedeiras e reprodutoras (FERREIRA; KNÖBL, 2020).

Além da classificação em sorotipos, são categorizadas quanto ao local de infecção, sendo *E. coli* diarreiogênica, que causam infecção intestinal, representadas pelos patótipos EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e EIEC (*E. coli* enteroinvasora); e extra-intestinais, representada pelo patótipo ExPEC (CONCEIÇÃO et al., 2012; MARTINEZ; TADDEI, 2015). Estirpes de ExPEC causam infecções em sítios extra-intestinais, incluindo infecções do trato urinário (UPEC) e meningites (MNEC), seps

(SEPEC), além da colibacilose aviária causada por *E. coli* patogênica aviária (APEC) (DALE; WOODFORD, 2015; FERREIRA; KNÖBL, 2020).

O patotipo ExPEC apresenta elevada diversidade genética entre as estirpes, com sobreposição de diversos sorogrupos que afetam humanos e animais. Esta sobreposição de fatores de virulência e de sorogrupos reforça a ideia de caráter zoonótico, com possibilidade de transmissão entre humanos e animais, pelo contato direto e pelo consumo de produtos de origem animal (MALUTA et al., 2014).

Apesar da grande diversidade de sorotipos distribuídos mundialmente, *E. coli* apresenta linhagens estáveis, com poucos genótipos diferentes, classificados como filogrupos, não afetados pela seleção natural (TENAILLON et al., 2010).

A virulência de ExPEC está relacionada a fatores genéticos, entre eles, adesinas, sideróforos ou sistemas de captação de ferro, toxinas e protectinas. A mesma estirpe pode apresentar diversos codificantes para o mesmo atributo (SILVA; SANTOS, 2015). Os principais marcadores de virulência dos patotipos de *E. coli* estão representados no Quadro 1.

Estirpes de *Escherichia coli* patogênica aviária apresentam um repertório de virulência muito heterogêneo, mas normalmente são portadoras do plasmídeo de colicina V, dos genes que codificam fímbria tipo 1, fímbria P e TSH, podendo codificar também a hemolisina aviária, a toxina Vat, aerobactina e sistemas de sobrevivência sérica (*iss*) (FERREIRA; KNÖBL, 2020).

Quadro 1. Principais marcadores de virulência de *E. coli* patogênicas

Fator de virulência	Categoria	Patotipo	Gene
Fímbria tipo 1	Adesina	Todos	<i>Fim</i>
Intimina	Adesina	EPEC/ EHEC	<i>Eae</i>
Fímbria P	Adesina	ExPEC	<i>Pap</i>
Fímbria S	Adesina	ExPEC	<i>Sfa</i>
<i>Adesina BFP (Bundle-forming pilus)</i>	Adesina	EPEC	<i>Bfp</i>
<i>Hemaglutinina termo sensível</i>	Adesina	APEC	<i>Tsh</i>
Enterotoxina termoestável a (STa)	Toxina	ETEC	<i>Sta</i>
Enterotoxina termoestável b (STb)	Toxina	ETEC	<i>Stb</i>
Enterotoxina termolábil (LT)	Toxina	ETEC	<i>Lt</i>
Shiga toxina (Stx)	Toxina	EHEC/STEC	<i>Stx</i>
Toxina termo estável - EAST-1	Toxina	EAEC	<i>Ast</i>
Toxina codificada por plasmídeo	Toxina	EAEC	<i>Pet</i>
Toxina Vacuolizante	Toxina	ExPEC	<i>Vat</i>
Toxina auto transportadora secretada	Toxina	ExPEC	<i>Sat</i>
Fator citotóxico necrosante (CNF)	Toxina	ExPEC	<i>cnf</i>
Alfa-hemolisina	Toxina	ExPEC	<i>hlyA</i>
Hemolisina aviária	Toxina	APEC	<i>hlyF</i>
Receptor de Salmochelina	Aquisição de ferro	ExPEC	<i>iroN</i>
Síntese de aerobactina Receptor de aerobactina	Aquisição de ferro	ExPEC	<i>iuc/iut</i>
Receptor de Yersiniabactina	Aquisição de ferro	ExPEC	<i>fyuA</i>
Operon de colicina V	Resistência sérica	APEC	<i>cvi/cva</i>
Aumento de resistência sérica	Resistência sérica	ExPEC	<i>Iss</i>
Proteína de transferência	Resistência sérica	ExPEC	<i>tratT</i>
Antígeno capsular K1	Resistência sérica	ExPEC	<i>neuC</i>
Proteínas de membrana externa	Resistência sérica	ExPEC	<i>ompA/ompT</i>
Invasão de endotélio vascular	Invasina	ExPEC	<i>ibeA</i>
Ilha de patogenidade de meningite neonatal	Invasina	MNEC	<i>gimB</i>

Fonte: Adaptado de Ferreira, Knöbl, 2020.

2.2. COLIBACILOSE

E. coli é um importante agente de diarreia endêmica e epidêmica por todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento (BUERIS et al., 2007). A colibacilose, infecção por *Escherichia coli*, acomete diversos animais, incluindo humanos, bovinos, suínos, ovinos e aves. Em bovinos, suínos e ovinos ETEC pode causar diarreia neonatal, doença aguda caracterizada por diarreia severa podendo causar morte devido aderência em vilosidades intestinais e produção de enterotoxinas termolábeis e termoestáveis (WRAY; MORRIS, 1985).

Nas aves, a colibacilose é considerada uma doença sistêmica multifatorial, associada à presença de estirpes de APEC e de fatores que favoreçam a produção de muco em traqueia e colonização do trato respiratório, tais como poeira, amônia, infecções por micoplasma, pneumovírus e coronavírus (vírus da bronquite infecciosa das galinhas) (FERREIRA; KNÖBL, 2020). Devido ao impacto econômico por condenações de carcaça decorrentes dos processos de aerossaculite e celulite, a colibacilose apresenta grande importância em avicultura comercial. De acordo com relatório do Serviço de Inspeção Federal (SIF) em 2019 mais de 38 milhões (38.664.150 unidades) de aves abatidas tiveram condenação total de carcaça, sendo 6,1% devido a colibacilose (2.358.067 unidades); e esses dados não consideram condenação de carcaças por aerossaculite, hepatite e pericardite, também desencadeadas por colibacilose (FERREIRA; KNÖBL, 2009). Outros sinais clínicos observados em aves com colibacilose são: pneumonia, celulite, coligranuloma, colisepticemia, doença respiratória crônica complicada, onfalite, salpingite e peritonite (CRMV-MG, 2015; BRASIL, 2019).

A colibacilose também apresenta importância para Saúde Pública pela possibilidade de contaminação de carcaça no momento do abate, podendo causar infecção intestinal aguda em humanos. Essa contaminação pode favorecer também a disseminação de estirpes de ExPEC resistentes a antimicrobianos, incluindo as linhagens pandêmicas do ST131 (LINTON et al., 1977; SAIDENBERG et al., 2020).

Nas granjas, a transmissão de APEC ocorre pela via horizontal, causada pela contaminação fecal, fômites, ração e água. A contaminação de ovos, via vertical ou por contato com fezes, pode resultar em transmissão para pintinhos,

podendo resultar em mortalidade embrionária (FERREIRA; KNÖBL, 2009; KABIR, 2010).

O diagnóstico da colibacilose aviária se dá pelo isolamento de *E. coli* em tecidos afetados e sangue cardíaco ou medula óssea. A identificação do agente pode ser feita por meio de testes bioquímicos ou moleculares (KABIR, 2010).

2.3. PROCESSOS PARA REDUÇÃO DA CARGA MICROBIANA

Para redução da carga microbiana total são indicados processos de esterilização, antissepsia ou desinfecção, devendo ser escolhidos de acordo com a superfície ou equipamento. Para alta eficiência dos processos de desinfecção e esterilização é necessário que haja remoção prévia de matéria orgânica. A eficiência desses processos pode ser alterada devido ao tipo e carga microbiana, presença de biofilme, tempo de exposição aos esterilizadores químicos, característica da superfície, entre outros fatores (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

Esterilização é o processo físico ou químico para eliminação da carga microbiana total incluindo a eliminação de esporos fúngicos. Alguns exemplos de métodos de esterilização são: vapor sob pressão, radiação ultravioleta, gás seco, óxido de etileno, produtos químicos líquidos e esterilizadores químicos (LUQUE GÓMEZ; MARECA DOÑATE, 2019).

Antissépticos também são utilizados para redução ou eliminação da carga microbiana, devendo ser usados em tecidos vivos, de forma tópica. Os compostos usados para antissepsia não devem ser os mesmos utilizados na desinfecção, para que não haja riscos de lesão tecidual (LUQUE GÓMEZ; MARECA DOÑATE, 2019).

Desinfetantes são formulados a partir de compostos químicos ou físicos microbicidas, devendo ser aplicadas em superfícies não vivas. O processo de desinfecção corresponde na utilização de esterilizadores químicos ou calor úmido, para eliminação ou redução da carga microbiana total, exceto esporos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

A escolha de um desinfetante ideal deve considerar algumas propriedades, entre elas: amplo espectro bacteriano, rápida ação, não afetado

por fatores ambientais como temperatura e presença de matéria orgânica, compatibilidade com a superfície não causando corrosão, inodoro, econômico, solúvel e estável, facilidade de descarte além de não ser tóxico ou ter efeito residual (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

No Brasil, a Resolução de Diretoria Colegiada RDC 35/2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta o uso de desinfetantes e sanitizantes de superfícies em artigos críticos e semicríticos (BRASIL, 2010).

2.4. COMPOSTOS DE AMÔNIA QUATERNÁRIA

Compostos de amônia quaternária (*Quaternary ammonium compounds* - QAC) são antimicrobianos catiônicos fortes, amplamente utilizados para limpeza e desinfecção de instalações em hospitais, clínicas, escolas, indústrias, restaurantes e instalações veterinárias. Os QAC são desinfetantes de alta qualidade, mas a capacidade de destruir micobactérias, vírus não envelopados e esporos bacterianos é limitada e pode variar em função das diferentes formulações do produto, concentração, condições de uso e tempo de exposição (BRASIL, 2002).

Os mecanismos de ação antimicrobiana incluem a inativação de enzimas produtoras de energia, a desnaturação de proteínas e a quebra da membrana celular. Os produtos são normalmente utilizados em concentrações que variam entre 1.000 e 5.000 ppm, associados às formulações de detergentes, necessitando de enxague completo após o uso (BRASIL, 2012).

São reconhecidos na atualidade, cinco gerações de QAC, como ilustra o quadro 2. Os desinfetantes de primeira geração, como o Cloreto de benzalcônio, são os mais utilizados na avicultura brasileira, em função da relação custo-benefício (DALTIM, 2011; SHABAN et al., 2013).

Quadro 2. Propriedades dos compostos de amônia quaternária-QAC

QAC	Nome do composto	Características
1ª. Geração	Cloreto de N-alquil-dimetil-benzil amônio (cloreto de benzalcônio)	Atividade bactericida de amplo espectro. Baixo custo. Não atua bem na presença de matéria orgânica ou água dura*. Baixo poder fungicida.
2ª. Geração	Cloreto de etilbenzil Cloreto dialquil-dimetil-amônio	Atividade bactericida mesmo na presença de água dura. Maior ação fungicida.
3ª. Geração	Mistura de Cloreto de benzalcônio e Cloreto de etilbenzil	Atividade bactericida e fungicida maior que as gerações anteriores de QAC, atuando na presença de água dura.
4ª. Geração	Quaternários de cadeia linear Cloreto de dimetil amônio Cloreto de dimetil dioctil amônio Cloreto de didecil dimetil Amônio	Atividade bactericida superior. Atua melhor na presença de matéria orgânica e água dura. Menor formação de espuma e menor toxicidade. Maior custo
5ª. Geração	Mistura de Cloreto de didecil dimetil amônio e Cloreto de n-Alquil dimetil benzil amônio	Atividade germicida, com redução de custos. Atua como biocida, tensoativo e desengraxante, na presença de água dura e de matéria orgânica.

*Água dura: presença de carbonato de cálcio, sulfato de cálcio ou sulfato de magnésio na água.

Fonte: adaptado de ANVISA. (BRASIL, 2012).

A estrutura química do QAC (Figura 1) demonstra que a porção catiônica é formada por ligação covalente de nitrogênio a quatro radicais que podem substituir o hidrogênio, sendo grupo alquila ou grupo arila. Já a porção aniônica é carregada negativamente, sendo normalmente cloreto ou brometo. A junção da porção catiônica e aniônica resulta nos sais ou compostos de amônia quaternária. As variações estruturais na porção catiônica, como a quantidade de nitrogênio e grupos arila ou alquila, e na porção aniônica afetam a atividade antimicrobiana, diferenciando assim os compostos quanto a dose e tempo de ação (GERBA, 2015).

Figura 1. Estrutura química geral de QAC

Fonte: GERBA, C. 2015

Os QAC, tensoativos catiônicos, adsorvem-se às células bacterianas em sítios de adsorção de nitrogênio, penetrando na membrana celular. Após a penetração ocorre a desorganização da membrana celular, devido a interação com a membrana citoplasmática, a desorganização permite que materiais intracelulares vazem da célula. Por fim, ocorre a indução de enzimas autolíticas, capazes de lisar a parede celular, além de provocar a desnaturação de proteínas devido a alterações no metabolismo (GERBA, 2015). Também são capazes de transformar a membrana bacteriana em hidrofóbica, impedindo a entrada de nutrientes (LADOW et al., 2011; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019). A atividade antimicrobiana é exercida principalmente pelas cadeias de alquil C-12 e C-14 do cloreto de benzalcônio, as duas cadeias C-10 do Cloreto de didecil dimetil amônio e pelas cadeias C-12, C-14 e C-16 do Cloreto de n-Alquil dimetil benzil amônio (GERBA, 2015).

Os QAC são considerados desinfetantes de alto nível, pois são capazes de destruir esporos fúngicos. A eficiência dos compostos pode ser reduzida devido a dureza da água, precipitação insolúvel após contato com substâncias aniônicas ou tipo bacteriano, já que bactérias Gram positivas são mais sensíveis aos QAC. Bactérias Gram negativas podem não ser completamente inibidas por QAC, uma vez que estas possuem mecanismos de resistência aos antimicrobianos (TEZEL; PIERSON; PAVLOSTATHIS, 2007).

2.5. RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

O uso de QAC em larga escala tem resultado no aumento de relatos de resistência a esses agentes (TEZEL; PIERSON; PAVLOSTATHIS, 2007). Bactérias susceptíveis expostas a dose subinibitórias podem adquirir genes de

resistência ou se adaptar-se ao antimicrobiano, devido à pressão seletiva (SOUMET et al., 2012). A concentração subinibitória é uma condição muito frequente a campo, e pode ocorrer por diluição incorreta do produto, expondo assim os microrganismos à sub doses do desinfetante por tempo prolongado (BUFFET-BATAILLON et al., 2012).

A resistência aos desinfetantes pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é natural e inclui inúmeros mecanismos, como por exemplo nos casos em que a parede celular de bactérias Gram negativas atua como uma barreira à permeabilidade do agente. Já a resistência adquirida ocorre por meio da aquisição de genes de resistência e pode ser mediada por plasmídeos, integrons e transposons, ou por mutação gênica (KUMAR; MUKHERJEE; VARELA, 2013; BRAGG et al., 2014).

Os principais mecanismos responsáveis pela resistência são: alteração do sítio de ligação de antimicrobianos, aparecimento de enzimas capazes de inativar antimicrobianos, diminuição da permeabilidade da membrana e super expressão de bombas de efluxo (VAN BAMBEKE; BALZI; TULKENS, 2000).

E. coli se adapta a concentrações subinibitórias de QAC aumentando a expressão de porinas, bombas de efluxo e componentes de resistência a antibióticos e proteção contra estresse oxidativo (HEGSTAD et al., 2010).

Os genes *sugE(c)* (supressor da chaperona *groEl*) e *qacE* (bomba de efluxo de cátions lipofílicos) codificam proteínas que são membros da família de resistência a múltiplas drogas (SMR – *small multidrug resistance*), pois usam o gradiente de próton como força motriz, favorecendo a expulsão de estruturas catiônicas da célula (BRAGG et al., 2014). O mecanismo da bomba de efluxo inicia com a ligação, mediada por prótons, do desinfetante com segmento transmembrana, que é então translocado através da membrana, e para isso ocorrem mudanças conformacionais na proteína. Em seguida, os prótons presentes no meio se ligam à proteína, substituindo a ligação desinfetante-carreador. A proteína retorna à conformação no estágio inicial. Há aumento de prótons no citosol, que podem ser utilizados para retirar outra molécula de desinfetante da célula (PAULSEN et al., 1996).

A transferência horizontal por meio de elementos genéticos móveis desempenha um importante papel na aquisição de genes de resistência a

antimicrobianos, principalmente do gene *qacE*, que é associado a presença de plasmídeos (ZOU et al., 2014).

A resistência a QAC relaciona-se também com a resistência aos antibióticos, por meio de co-resistência (devido a presença de dois ou mais mecanismos de resistência presentes no mesmo ambiente genético) ou por resistência cruzada (presença de um mecanismo de resistência para dois ou mais agentes) (BUFFET-BATAILLON et al., 2012; HAN et al., 2019). Algumas bombas de efluxo de antibióticos, como a regulada pela proteína MarA, gera resistência a antibióticos, desinfetantes, solventes orgânicos, antissépticos e sais biliares em enterobactérias (LEVY, 2002).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar a presença e determinar a prevalência de *qacE* e *sugE(c)*, genes de resistência a QAC, em *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte e galinhas de postura.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Determinar a frequência de ocorrência dos genes *qacE* e *sugE(c)* em estirpes de *Escherichia coli* de origem fecal em frangos de corte.

2- Determinar a frequência de ocorrência dos genes *qacE* e *sugE(c)* em estirpes de *Escherichia coli* de origem fecal em aves de postura comercial.

3- Determinar a frequência de ocorrência dos genes *qacE* e *sugE(c)* em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de origem clínica, de aves com colibacilose aviária.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS

Para esse estudo foram selecionados 422 isolados de *E. coli* pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Medicina Aviária – Departamento de Patologia da FMVZ-USP. As estirpes foram selecionadas segundo critério de amostragem não probabilística, por conveniência. O tamanho da amostra foi definido com base no cronograma e nos recursos financeiros disponíveis, e equivalem a uma população superior à 100.000.000 de indivíduos, adotando-se um intervalo de confiança de 95% e um erro amostral de 5%. O estudo foi aprovado pela CEUAX- protocolo 3328060320.

Amostras de fezes cloacais e de tecidos previamente coletadas de galinhas comerciais (*Gallus gallus*), com auxílio de suabe seco foram submetidas ao cultivo, isolamento e identificação bacteriana. Os isolados foram armazenados em ágar LB, mantidos em temperatura ambiente. As estirpes selecionadas para este estudo foram agrupadas de acordo com a origem em: isolados fecais de frangos de corte (n=120); isolados fecais de poedeiras comerciais (n=182); estirpes de APEC, isoladas de aves com colibacilose aviária (n=120), e submetidas à PCR.

4.1.1 Isolados fecais de frangos de corte

Procedentes do processamento microbiológico de amostras cloacais de 120 frangos de corte saudáveis, que foram coletadas entre os anos de 2011 a 2020 em granjas dos estados de Minas Gerais (MG), São Paulo (SP) e Paraná (PR).

4.1.2 Isolados fecais de aves de postura comercial

Procedentes do processamento microbiológico de amostras cloacais de 182 galinhas de postura, coletadas entre os anos 2011 a 2020 em granjas dos estados de São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG).

4.1.3 Estirpes de APEC

Foram analisadas 120 estirpes de APEC. Destas, 72 foram isoladas de fígado e coração de aves, após exames de necropsias realizados entre 2011 e 2020, em diferentes surtos de colibacilose ocorridos nos estados de São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG). Outras 48 foram isoladas em setembro de 2019, de aves com lesões compatíveis com quadros de colibacilose, e que foram desviadas para o DIF (Departamento de Inspeção Federal) em um matadouro-frigorífico em São Paulo (SP). No abatedouro, o material foi coletado com suabe contendo meio de transporte (meio de Stuart), sendo processado no dia posterior ao dia da coleta.

A distribuição destes isolados está representada nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Distribuição dos isolados de *E. coli*, conforme origem, estado e ano.

Origem	Local de coleta	Estados	Ano de isolamento	Número de estirpes
Fecal	Granja de frangos de corte	SP, MG, PR	2011-2020	120
Fecal	Granja de Postura Comercial	SP, MG	2011-2020	182
Clínica	Serviço de necropsia e abatedouro	SP, MG	2011-2020	120
Total				422

Fonte: Barbosa, F.B. (Dissertação, 2020)

Tabela 2. Lesões observadas em aves condenadas por colibacilose em abatedouro. São Paulo. 2019.

Lesão	Número de isolados
Abscesso	2
Aerossaculite	3
Ascite	2
Celulite	25
Perihepatite	8
Pneumonia	2
Salpingite	1
Tríade (aerossaculite, pericardite e perihepatite)	5
Total	48

Fonte: Barbosa, F.B. (Dissertação, 2020)

4.2 PROCESSAMENTO DAS ESTIRPES BACTERIANAS

O processamento das estirpes bacterianas foi feito no Laboratório de Medicina Aviária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As amostras foram reativadas do estoque após etapa de pré-enriquecimento em água peptonada (Difco™ - BD®), caldo não seletivo, e cultivo em ágar MacConkey (Difco™- BD®), meio seletivo para bactérias Gam negativas. Caldos e meios foram incubados a 37°C por 18 a 24 horas.

A confirmação da identificação de todas as estirpes de *Escherichia coli* foi realizada pela espectrometria de massa, com uso do MALDI-TOF MS, ferramenta proteômica, capaz de analisar o material biológico a partir de uma matriz polimérica e analisador de massa capaz de medir o tempo de voo das frações proteicas do patógeno. Para identificação foi realizada a extração da proteína bacteriana, utilizando protocolo de extração por álcool (Emsure®) acetonitrila (Sigma-Aldrich®) (CHAPMAN, 2003).

Foi feita a suspensão de uma colônia em microtubo de 1,5 mL com 300 µL de água deionizada, seguida de adição de 900 µL de etanol absoluto, capaz de desidratar o agente. Foi feita agitação e centrifugação do microtubo à 12.800 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e a amostra foi mantida em repouso, à temperatura ambiente até secagem completamente. Foi então feita adição de 35 µL de ácido fórmico 70%, homogeneização e adição de 35 µL de acetonitrila, sendo agitada por inversão. Foi feita nova centrifugação, à 12.800 rpm por 3 minutos. Em seguida, o sobrenadante retirado mantido a temperatura de -20°C. e submetido ao MALDI-TOF MS (BIER et al, 2017). A identificação do agente foi baseada na comparação do espectro de massa da amostra com espectros de cepas de referência utilizando o programa Biotyper™ (MALDI Biotyper CA Systems 3.0), de acordo com as orientações do fabricante Bruker Daltonik, com atribuição de gênero e espécie para os escores superiores à 2.0 (KUHNERT et al., 2012).

4.3 PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA QAC PELA PCR

A extração do DNA foi feita pelo método de fervura. As amostras foram semeadas em microtubo de 1,5 mL contendo 300 µL BHI (*Brain heart infusion*, Difco™ – BD®), sendo incubadas à 37°C por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, foram centrifugadas a 12.800 rpm por 3 minutos, seguindo para a etapa de lavagem com água miliQ. Os microtubos foram centrifugados novamente, a 12.800 rpm por 3 minutos. Foi adicionado 165 µL de água ultra-pura (LGC Biotecnologia®). Os microtubos foram colocados em banho seco a 115°C por 15 minutos. Terminado o tempo, foi feita nova centrifugação a 12.800 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado e mantido a -20°C até o momento de processamento.

Para a padronização da técnica foram utilizadas cepas resistentes a QAC, pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Medicina Aviária, cuja resistência foi determinada a partir do sequenciamento do DNA total do agente. Os genes *qacE* e *sugE* foram pesquisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase chain reaction*) (CHAPMAN, 2003). As sequências de *primers* e as condições das reações estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3. Descrição dos genes, sequência dos primers, temperatura de anelamento, tamanho de amplicon e referências dos genes utilizados

Gene	Sequência de Primers (5'3')	Anelamento	Amplicon	Referências
<i>qacE</i>	AGCCCCATACCTACAAAG AGCTTGCCCCTTCCGC	55°C	194 bp	Gillings, 2010
<i>sugE(c)</i>	CTGCTGGAAGTGGTATGGG GCATCGGGTTAGCGGACT	55°C	226 bp	Zou et al., 2014

Fonte: BARBOSA, FB. (Dissertação, 2020).

A mistura para a PCR *uniplex* foi constituída por: 15,3 µL de água ultra-pura autoclavada (LGC Biotecnologia®), 20 pmol de cada *primer* listado no quadro 3 2,5 µL tampão para PCR 10 mM (*HOT FIREPol® Buffer* B1 – 0.7 M Tris-HCl, 0.175 M (NH₄)₂SO₄. - Solis BioDyne®), 1 µL MgCl₂ 25mM (Solis

BioDyne®), dNTP 10 mM (Uniscience®), Taq polimerase 1 U (*HOT FIREPoI*® DNA Polymerase – Solis BioDyne®) e 3 µL de DNA.

A amplificação foi realizada em termociclador (C1000 *Touch*™-BioRad®), com ciclo inicial de ativação da Taq DNA polimerase de 95°C por 15 minutos, seguido de 34 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, ciclo de anelamento a 58°C por 30 segundos, ciclo de extensão a 72°C por 60 segundos e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos.

Os produtos da amplificação foram separados na corrida eletroforética (*PowerPac*® Universal – Bio Rad®. Owl EasyCast™ B2-BP) a 100 V por 90 minutos em um gel de agarose 1,5% (LGC Biotecnologia®) e examinados após coloração, com *Blue Green Loading Dye* (LGC Biotecnologia®).

Os fragmentos foram visualizados a partir de iluminação ultra-violeta em sistema de fotodocumentação (*Molecular Imager*® System with *Image Lab*™ Software – Bio Rad®). O marcador de peso molecular utilizado foi o 100 bp DNA *ladder* (Sinapse inc®). As amostras foram analisadas quanto a sequência de oligossacarídeos e tamanhos de fragmentos, sendo comparados com as cepas de referência da coleção de cultura do Laboratório de Medicina Aviária.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad, utilizando o teste exato de Fisher, em tabela de contingência com duas caldas, considerando significativo valor-p < 0.05.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que 64,21% (271/422) das estirpes apresentaram o gene *qacE* e 42,65% (n=180/422) apresentaram o gene *sugE(c)*, conforme ilustram as figuras 2 e 3.

Figura 2. Frequência de ocorrência do gene *qacE* em isolados de *E. coli* aviária.

Fonte: BARBOSA, FB. (Dissertação, 2020).

Figura 3. Frequência de ocorrência do gene *sugE* em isolados de *E. coli* aviária.

Fonte: BARBOSA, FB. (Dissertação, 2020).

A frequência de ocorrência entre os isolados de *E. coli* fecais (AFEC) foi de 62,25% (n=188/302) para o gene *qacE*. Já na pesquisa do gene *sugE(c)* 37,41% (n=113/302) dos isolados foram positivos.

Na pesquisa de genes nas amostras clínicas (APEC) foi observado um percentual mais elevado para os dois genes, com 69,16% (n=83/120) dos isolados positivos para *qacE* e 55,83% (n=67/120) positivos para *sugE(c)*.

A figura 4 ilustra a frequência de ocorrência dos genes *qacE* e *sugE* (c) nos isolados de origem fecal (AFEC) e clínica (APEC).

Figura 4. Frequência de ocorrência dos genes *qacE* e *sugE(c)* em isolados de *Escherichia coli* de origem fecal (AFEC) e clínica (APEC).

Fonte: BARBOSA, FB. (Dissertação, 2020).

Em relação à distribuição destes genes de acordo com a origem foi possível observar que o gene *qacE* foi mais prevalente em isolados de fezes de frangos de corte (78,33%), seguido pelos isolados clínicos (69,16%), sendo menos prevalente entre os isolados de fezes de aves de postura (51,64%). Já o gene *sugE*, foi mais prevalente entre isolados clínicos (55,83%), seguido pelos isolados de fezes de poedeiras (48,35%), sendo menos prevalente entre os isolados de fezes de frangos de corte (20,83%). Os resultados estão apresentados na Tabela 3 e ilustrados na figura 5.

Tabela 3. Frequência de ocorrência dos genes de resistência a QAC (*qacE* e *sugE*) em isolados de *E. coli* de origem aviária.

Origem	Frequência de isolados positivos	
	<i>qacE</i>	<i>sugE(c)</i>
Fezes de frangos de corte	94/120 (78,33%)	25/120 (20,83%)
Fezes de Poedeiras	94/182 (51,64%)	88/182 (48,35%)
APEC	83/120 (69,16%)	67/120 (55,83%)
Total	271/422 (64,21%)	180/422 (42,65%)

Fonte: BARBOSA, FB. (Dissertação, 2020).

Figura 5. Frequência de ocorrência dos genes *qacE* e *sugE(c)* em *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte (FC), poedeiras comerciais (PC) e de amostras clínicas (APEC).

Fonte: BARBOSA, FB. (Dissertação, 2020).

6. DISCUSSÃO

A resistência a antimicrobiano consiste num problema global, sendo um grande risco para Saúde Pública. O desenvolvimento de novas drogas efetivas demanda alto investimento financeiro e intelectual; logo, o controle da emergência de resistência é considerado a melhor alternativa para a contenção do problema (WHO, 2001). Desde o surgimento do Plano Global de Controle de Resistência Antimicrobiana, lançado pela aliança tripartite composta por OMS, OIE e FAO em 2015, os países signatários destes organismos internacionais têm se empenhado em reduzir o uso de antimicrobianos na medicina humana e nas criações animais (WHO, 2015). Neste contexto destaca-se a proibição de alguns aditivos alimentares melhoradores de desempenho, como a colistina, tilosina, tiamulina e lincomicina para uso nas criações de aves e suínos no Brasil (BRASIL, 2018).

Notadamente as políticas de redução de uso de antimicrobiano têm focado na restrição de uso de antibióticos, principalmente aqueles pertencentes às classes compartilhadas, e considerados criticamente importantes para a medicina humana. Pouca ou nenhuma atenção tem sido dispensada aos antimicrobianos que atuam como desinfetantes ou antissépticos, e é provável que estes passem a ser utilizados em maior escala dentro de programas de biossegurança, como alternativa à proibição do uso de antibióticos nas criações animais. Um exemplo desta situação é o lançamento do Programa de Biossegurança de Bastos, em São Paulo, que visa a sanidade de aves de postura e preconiza a pulverização diária de desinfetantes sobre as galinhas (OVO, 2016). Não existem estudos científicos que avaliem o impacto que este uso intensivo de desinfetantes pode exercer sobre população de bactérias residentes na microbiota e nem mesmo sobre os riscos de intoxicação das aves, mas é provável que algumas práticas de manejo possam favorecer a seleção de bactérias com capacidade de resistir à ação destes biocidas. *sugE(c)*, gene codificado pelo cromossomo, e *qacE*, gene codificado por elementos genéticos móveis, são marcadores genéticos importantes para a vigilância de resistência a QAC e os resultados de prevalência desses genes podem contribuir para o desenvolvimento de planos de uso de antimicrobianos, e assim controle da emergência de resistência (WHO, 2001).

Os dados deste trabalho revelaram que 64,21% das estirpes avaliadas apresentam o gene *qacE* e 42,65% foram positivas para *sugE(c)* (Figuras 2 e 3). Os resultados de prevalência de *sugE(c)* encontrados neste estudo se assemelham aos dados relatados em outros países. Na China os autores apontam uma prevalência de *sugE(c)* variando entre 71,57% (SUN et al., 2019) e 88,3% (JIANG et al., 2017). Nos Estados Unidos Zou e colaboradores (2014) relataram um percentual de 84% de estirpes positivas (ZOU et al., 2014). Já a frequência do gene *qacE* reportada em nosso estudo foi superior aos relatos da China (JIANG et al., 2017; SUN et al., 2019) e dos Estados Unidos ((ZOU et al., 2014). Jiang et al. (2017) encontraram uma prevalência de 28,5% de *qacE* em isolados de *E. coli* aviária, mas Sun et al. (2019) e Zou et al. (2014) não encontraram amostras positivas para *qacE*. Esse resultado pode ser devido ao desenho de primer utilizados, que difere de outros estudos, ou significar menor circulação de estirpes portadoras de plasmídeos de resistência QAC nas áreas analisadas.

A presença dos genes de resistência QAC foi observada tanto em isolados de amostras de origem fecal como nos isolados clínicos de APEC (Figura 4). Embora os isolados clínicos apresentem um percentual maior de ambos os genes (69,16% *qacE* e 55,83% de *sugE(c)*) na comparação com os isolados fecais (62,25% *qacE* e 37,41% de *sugE(c)*), apenas as diferenças entre o gene *sugE(c)* foram consideradas estatisticamente significantes (valor de $P=0.0007$).

O gene *qacE* foi mais prevalente nos isolados fecais de frangos de corte, com diferença estatisticamente superior aos dados obtidos nas aves de postura (valor de $P=0.0007$). Diferenças significativas também foram observadas para a frequência de ocorrência de *sugE(c)*, mas desta vez o gene foi mais frequente nos isolados de aves de postura comercial (valor de $P=0.0001$) (Figura 5). Não é possível atribuir uma razão específica para estas diferenças de distribuição dos genes entre os diversos segmentos da cadeia de produtos avícolas (aves e ovos). Novos estudos devem avaliar o modo como o manejo e o uso de antimicrobianos em granjas de postura e de frangos de corte interferem na seleção destas bactérias. Talvez estas diferenças possam estar relacionadas ao ambiente genético dos genes de resistência à QAC.

Um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa estabeleceu uma relação entre a presença do gene *sugE*, e a resistência antimicrobiana codificada pela enzima *bla*CMY-2. Já o ambiente genético do gene *qacE* teve uma associação positiva com Integron de classe 1, portador dos genes de resistência aos aminoglicosídeos, beta-lactâmicos e sulfa/trimetoprim, e com o gene de beta-lactamase de espectro estendido *bla*CTX-M-2 (BARBOSA et al., 2020). Desta forma, a epidemiologia destes determinantes de resistência pode sofrer influência de outros marcadores de resistência em um processo de co-seleção, o que torna complexa a interpretação de dados baseada em um único componente de resistência.

Os resultados encontrados confirmam a importância de bombas de efluxo na resistência a QAC, sendo necessários outros estudos para avaliação da expressão desses genes, por testes fenotípicos de análise de resistência a desinfetantes e antibióticos, como a microdiluição em caldo e antibiograma.

Muñoz (2019) avaliou a interferência dos marcadores de resistência a QAC em 100 amostras de bactérias com fenótipo de multirresistência isoladas no Brasil, incluindo *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* e *Acinetobacter baumannii* e discutiu a relação dos genes de resistência com o aumento da concentração inibitória mínima em isolados de importância clínica humana, animal e ambiental. O autor sequenciou 30 estirpes de *Escherichia coli* e a frequência de ocorrência de *qacE* e *sugE(c)* foi de 40% e 93%, respectivamente. No entanto, apenas 15 estirpes eram de origem animal e a maioria delas foi isolada de animais de companhia ou silvestres (MUÑOZ; HUENUMAN, 2019).

Considerando que o Brasil é um dos maiores produtores de aves do mundo e que os produtores necessitam de orientação quanto ao uso de desinfetantes, há necessidade de novos estudos para melhor entendimento da relação de elementos genéticos móveis e outras bombas de efluxo na disseminação de resistência a QAC.

7. CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou que *E. coli* isolada de aves comerciais apresentam genes que codificam mecanismos de resistência a QAC, enfatizando o risco de disseminação destes genes. Os dados do presente estudo promovem embasamento para novas pesquisas de caracterização de resistência a QAC.

REFERÊNCIAS

- ABPA, A. B. de P. A. **Relatório Anual**. 2020.
- AGEITEC, A. E. de I. T.; CARON, L.; JAENISCH, F. R. F. **Biosseguridade**. 2020.
- BARBOSA, F. B. et al. Relação entre genes de resistência a compostos de amônia quaternária e antimicrobianos em *Escherichia coli* isoladas de aves de produção. In: **PRÊMIO LAMAS. CONFERÊNCIA FACTA., Anais**. 2020. Disponível em: <www.facta.org.br>. Acesso: 17 de dezembro de 2020.
- BASSI, N. S. S.; SILVA, C. L. da. Oportunidades e desafios em pd&i na cadeia produtiva de frangos de corte. **Agropensa**. 2014.
- BIER, D.; TUTIJA, J. F.; PASQUATTI, T. N.; OLIVEIRA, T. L.; ARAÚJO, F. R.; VERBISCK, N. v. Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 1373–1379, 2017.
- BRAGG, R. et al. Bacterial resistance to quaternary ammonium compounds (QAC) disinfectants. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 808, p. 1–13, 2014.
- BRASIL. Programa Nacional de Sanidade Avícola. p. 312, 2002.
- BRASIL. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 56, DE 4 DE DEZEMBRO DE 2007**. 2007.
- BRASIL. **RESOLUÇÃO-RDC Nº 35, DE 16 DE AGOSTO DE 2010**. 2010.
- BRASIL. **Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. 2012.
- BRASIL. **PAN-BR Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única**. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. 2018.
- BRASIL. **Destino de Materias Primas e Produtos por UF (Mapa H)**. 2019.
- BRASIL. **PROGRAMA NACIONAL DE SANIDADE AVÍCOLA (PNSA)**. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/programa-nacional-de-sanidade-avicola-pnsa>> Acesso: 12 de dezembro de 2020.
- BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memória Inst Oswaldo Cruz**. 2007.
- BUFFET-BATAILLON, S. et al. Emergence of resistance to antibacterial agents: The role of quaternary ammonium compounds - A critical review. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008; Miscellaneous Inactivating Agents. **CDC website**, n. May, p. 9–10; 24–25; 29:30; 53–54; 98–105; 113. Disponível em:

<http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection_Sterilization/10_0MiscAgents.html>. 2019

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 271–276, 2003.

CONCEIÇÃO, R. A. et al. Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 5, p. 417–424. 2012.

CRMV-MG, C. R. de M. V. do E. de M. G. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. Disponível em: <www.crmvmg.org.br>. 2015.

DA ROSA, G. et al. Impact of colibacillosis on production in laying hens associated with interference of the phosphotransfer network and oxidative stress. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 131–136. 2019.

DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. **Journal of Infection**, v. 71, n. 6, p. 615–626. 2015.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. 1ª ed. São Paulo: Blusher, 2011.

D'ARI, R.; SEZONOV, G. **Os organismos-modelo: biologia e genética da *Escherichia coli***. 1ª. ed. Brasil: Edusp, 2014.

EMBRAPA, E. B. de P. A. Estatísticas | Mundo | Frangos de corte. Disponível em <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>> Acesso: 15 de novembro de 2020.

EWERS, C. et al. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 104, n. 1–2, p. 91–101. 2004.

FERREIRA, J. A. P.; KNÖBL, T. Colibacilose. In: JÚNIOR, A. B. et al. (Ed.). **Doença das Aves**. 2. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009.

FERREIRA, J. A. P.; KNÖBL, T. Colibacilose. In: FILHO, R. L. A. et al. (Ed.). **Doença Das Aves**. 3. ed. 2020.

GERBA, C. P. Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application. **Applied and Environmental Microbiology**American Society for Microbiology. 2015.

GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2016.

HAN, Y. et al. The impact and mechanism of quaternary ammonium compounds on the transmission of antibiotic resistance genes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 27, p. 28352–28360. 2019.

HEGSTAD, K. et al. Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health? **Microbial Drug Resistance**, v. 16. 2010.

IEC, International Egg Commission. **Atlas of the Global Egg Industry**. 2013.

JIANG, X. et al. Characterization and horizontal transfer of qacH-associated class 1 integrons in *Escherichia coli* isolated from retail meats. **International Journal of Food Microbiology**, v. 258, p. 12–17. 2017.

KABIR, S. M. L. Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 1, p. 89–114. 2010.

KUHNERT, P. et al. Identification of animal Pasteurellaceae by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, n. 1, p. 1–7. 2012.

KUMAR, S.; MUKHERJEE, M. M.; VARELA, M. F. Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. **International Journal of Bacteriology**, v. 2013, p. 1–15. 2013.

LADOW, J. E. et al. Bicephalic amphiphile architecture affects antibacterial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4219–4226. 2011.

LEVY, S. B. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 92, p. 65–71. 2002.

LINTON, A. H. et al. Antibiotic Resistance among *Escherichia coli* O-serotypes from the Gut and Carcasses of Commercially Slaughtered Broiler Chickens: a Potential Public Health Hazard. **Journal of Applied Bacteriology**. 1977.

LUQUE GÓMEZ, P.; MARECA DOÑATE, R. Basics concepts about asepsis and antiseptics. **Medicina Intensiva**, v. 43, p. 2–6. 2019.

MALUTA, R. P. et al. Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8. 2014.

MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R. Enterobacteriaceae. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

MUÑOZ, M. E. E.; HUENUMAN, N. E. L. Resistência aos compostos de amônio quaternário (QACs) de uso doméstico e hospitalar em patógenos prioritários multirresistentes. 2019. Disponível em <
<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-02072019->

[182022/publico/Maria_Elena_Espinoza_Munoz_ME_Corrigida.pdf](#)> Acesso: 12 de junho de 2020.

ORI, E. L. et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: Pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. **Epidemiology and Infection**, v. 147, 2019.

OVO, Canal do. BIOSSEGURIDADE, o programa de Bastos (SP). Disponível em <https://www.youtube.com/watch?v=FEMMwTY6Q84&t=34s&ab_channel=CanaldoOvo> 2016. Acesso: 10 de abril de 2020.

PAULSEN, F. T. et al. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. **Molecular Microbiology** (1 996), v. 19, n. 6, p. 175, 1996.

SAIDENBERG, A. B. S. et al. MCR-Positive *Escherichia coli* ST131-H22 from Poultry in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 8, p. 1951–1954. 2020.

SALLE, C. T. P.; MOARES, H. L. de S. Prevenção de doenças / Manejo profilático /Monitoria. In: JÚNIOR, A. B. et al. (Ed.). **Doença das Aves**. 2 ed. 501–13070.

SHABAN, R. Z. et al. **National surveillance of esistance usage and reporting antimicrobial r and antibiotic for human health in Australia**. 2013.

SILVA, R. M.; SANTOS, A. C. de M. *Escherichia coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC). In: TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2015.

SOUMET, C. et al. Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 158, n. 1–2, p. 147–152. 2012.

SUN, Y. et al. Disinfectant resistance profiles and biofilm formation capacity of *Escherichia coli* isolated from retail chicken. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 5, p. 703–711. 2019.

TBS REPORT. **Top 5 egg-producing countries**. Disponível em <<https://tbsnews.net/economy/agriculture/top-5-egg-producing-countries-2020-159202>> Acesso: 01 de dezembro de 2020.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. 2010.

TEZEL, U.; PIERSON, J. A.; PAVLOSTATHIS, S. G. Effect of polyelectrolytes and quaternary ammonium compounds on the anaerobic biological treatment of poultry processing wastewater. **Water Research**, v. 41, n. 6, p. 1334–1342, 2007.

VAN BAMBEKE, F.; BALZI, E.; TULKENS, P. M. Antibiotic Efflux Pumps. **Biochemical Pharmacology**, Vol. 60, pp. 457–470, 2000.

W. H. O. **Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance**. 2001.

WHO, W. H. O. **Global antimicrobial resistance surveillance system: manual for early implementation**. 2015.

WRAY, C.; MORRIS, J. A. Aspects of colibacillosis in farm animals. **J. Hyg., Camb.** 1985.

ZOU, L. et al. Presence of disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2644–2649. 2014.