LETICIA SOARES FRANCO

**Resistência e virulência de estirpes de *Escherichia fergusonii*
isoladas de aves comerciais e silvestres**

São Paulo

2018

LETICIA SOARES FRANCO

**Resistência e virulência de estirpes de *Escherichia fergusonii*
isoladas de aves comerciais e silvestres**

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:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Terezinha Knöbl

São Paulo

2018

ERRATA

FRANCO, L. S. **Resistência e virulência de estirpes de *Escherichia fergusonii* isoladas de aves comerciais e silvestres.** 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Página	Onde se lê	Leia-se
Resumo	65 f.	78 f.
Abstract	65 f.	78 f.

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. 3667
FMVZ

Franco, Leticia Soares
Resistência e virulência de estirpes de *Escherichia fergusonii* isoladas de aves comerciais e silvestres / Leticia Soares Franco. – 2018.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha Knöbl.

1. MALDI-TOF MS. 2. Microbiologia. 3. Virulência. 4. Resistência bacteriana. 5. Aves. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Pesquisa de resistência e virulência de cepas aviárias do gênero *Escherichia* (*E. coli*, *E. albertii* e *E. fergusonii*)", protocolada sob o CEUA nº 1299290616, sob a responsabilidade de **Terezinha Knöbl e equipe; Leticia Soares Franco** - 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 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2016.

We certify that the proposal "Survey of resistance and virulence of avian strains of *Escherichia* genera (*E. coli*, *E. albertii* and *E. fergusonii*)", utilizing 90 Birds (males and females), protocol number CEUA 1299290616, under the responsibility of **Terezinha Knöbl and team; Leticia Soares Franco** - 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 School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [07/2016](#) a [11/2018](#)

Área: [Patologia Experimental E Comparada](#)

Origem: [Amostras biológicas estocadas](#)

Espécie: [Aves](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 200 meses](#)

N: [30](#)

Linhagem: [Anseriformes](#)

Peso: [1 a 5 kg](#)

Origem: [Amostras biológicas estocadas](#)

Espécie: [Aves](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 200 meses](#)

N: [30](#)

Linhagem: [Passeriformes](#)

Peso: [20 a 30 kg](#)

Origem: [Amostras biológicas estocadas](#)

Espécie: [Aves](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [6 a 20 meses](#)

N: [30](#)

Linhagem: [Galliformes](#)

Peso: [1 a 3 kg](#)

Resumo: Este projeto vai avaliar as características genotípicas, fenotípicas e o perfil de resistência antimicrobiana de cepas aviárias do gênero *Escherichia* (*E. coli*, *E. albertii* e *E. fergusonii*)

Local do experimento: Laboratório de Medicina Aviária - Departamento de Patologia FMVZ-USP

São Paulo, 20 de junho de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Roseli da Costa Gomes
Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FRANCO, Leticia Soares

Título: **Resistência e virulência de estirpes de *Escherichia fergusonii* isoladas de aves comerciais e silvestres**

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: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais...

Aos meus animais...

...que sempre me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Terezinha Knöbl, pela oportunidade, atenção, disponibilidade, conversas, orientações e confiança nesses anos com a realização desse projeto.

À professora Dra Andrea Micke Moreno pela colaboração e contribuição. E à toda equipe do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia pelo apoio e disponibilidade, em especial ao Vasco Túlio de Moura Gomes e Carlos Cabrera, e à Luiza Zanolli Moreno.

À toda equipe do Laboratório de Medicina Aviária, Maria Gabriela, Yamê, Jessica, Rosely e Márcia pela companhia, ajuda e conversas diárias que ajudaram a melhorar a rotina.

Ao Marcos Paulo Vieira Cunha pela ajuda, orientação, conversas e amizade, tudo foi completamente fundamental para o meu crescimento e aprendizado.

Aos meus colegas do Departamento de Patologia Experimental e Comparada, pelas conversas e troca de informações diária.

Ao Prof. Dr. Fernando José Benesi do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP pela doação de sangue de carneiro.

Aos professores e funcionários do Ambulatório de Aves do HOVET FMVZ USP, pela colaboração.

Ao professor José Heitzmann Fontenelle, pela amizade e por ceder parte das amostras para o projeto.

A Roberta Marcatti pelo auxílio na coleta das amostras no clube em São Paulo.

À Ana Paula G. Christ, Maria Inês Z. Sato e Mikaela Roberta Funada Barbosa, pela identificação das amostras isoladas neste projeto, através do MALDI TOF.

Aos meus amigos que estiveram presentes durante todo esse percurso, me apoiando e me incentivando a continuar, Amanda, Andressa, Fernando, Laís, Leonardo, Paola, Rachel, Thaynná.

A Thábatta Medeiros por toda a companhia, preocupação, todo o carinho e incentivo.

Aos meus pais, Arleide e Odil, pelo incentivo, pela força e pelo amor e carinho, mesmo que de longe, todos os conselhos me serviram. Agradeço imensamente e eternamente tudo o que fazem por mim.

A minha avó Aliete por toda a preocupação e carinho e pelas ligações inesperadas. Foram conversas que me incentivavam a continuar. E a minha família por todo o amor e compreensão.

Aos meus animais, que sempre me motivaram a continuar tudo, e que mesmo de longe são extremamente amorosos e companheiros. Me inspiram todos os dias a continuar.

A todos que fizeram parte de alguma forma durante esse percurso, seja me incentivando, acreditando e aconselhando. Muito obrigada.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de mestrado – nº 130146/2017-0.

RESUMO

FRANCO, L.S. **Resistência e virulência de estirpes de *Escherichia fergusonii* isoladas de aves comerciais e silvestres.** [Virulence and Resistance of *Escherichia fergusonii* strains isolated from poultry and wild birds] 2018. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Escherichia fergusonii é um patógeno emergente na medicina humana e veterinária, nos relatos de casos de infecção em aves são escassos. O objetivo desse trabalho foi identificar e caracterizar estirpes de *E. fergusonii* isoladas de anatídeos de vida livre, aves cativas silvestres e aves comerciais criadas em sistemas convencionais e orgânico. Dentre as 431 amostras, foram isoladas 29 estirpes de *Escherichia fergusonii*, sendo a maior prevalência em galinhas no sistema de criação convencional. O perfil de sensibilidade das amostras foi avaliado, revelando diferenças entre os grupos, com a presença de estirpes de frangos no sistema de criação convencional apresentando maiores índices de resistência aos antimicrobianos testados, enquanto estirpes de irerês apresentaram sensibilidade a todos os antibióticos. Foram identificadas duas estirpes multirresistentes com resistência a mais de três classes de antimicrobianos. A caracterização molecular dessas amostras revelou estirpes de irerês (*Dendrocygna viduata*) com maior presença de genes de virulência (*iroN*, *cvi*, *cva*, *astA* e *ompT*). O ensaio de produção de hemolisinas em ágar sangue revelou amostras negativas, sem formação de hemólise ao redor da colônia. A técnica de AFLP classificou as estirpes em clados distintos sugerindo padrões de heterogeneidade entre as amostras. Esse é o primeiro relato de achados de *Escherichia fergusonii* em irerês de vida livre e gavião-pombo pequeno.

Palavras-chave: MALDI-TOF MS, microbiologia, virulência, resistência bacteriana, aves

ABSTRACT

FRANCO, L.S. **Virulence and resistance of *Escherichia fergusonii* strains isolated from poultry and wild birds.** [Resistência e virulência de estirpes de *Escherichia fergusonii* isoladas de aves comerciais e silvestres] 2018. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Escherichia fergusonii is an emerging pathogen in human and veterinary medicine, in cases reports associated with birds are scarce. The aims of this work were to identify and to characterize strains of *E. fergusonii* isolated from free-living ants, wild captive birds and poultry from conventional and organic farms. Among the 431 samples, 29 *Escherichia fergusonii* were isolated, being the highest prevalence in chickens from conventional breeding systems. The sensitivity profile of the samples was evaluated, revealing differences between the groups, with the higher antimicrobial resistance indexes in isolates from chicken in the conventional farms, while strains of white-faced whistling-duck showed sensitivity to all antibiotics. Two multiresistant strains with resistance to more than three classes of antimicrobial agents were identified. The molecular characterization of these samples revealed strains of white-faced whistling-duck (*Dendrocygna viduata*) with higher presence of virulence genes (*iroN*, *cvi*, *cva*, *astA* and *ompT*). The assay of hemolysin production on blood agar revealed negative strains, with no hemolysis forming around the colony. The AFLP technique classified the strains into distinct clades suggesting patterns of heterogeneity between the strains. This is the first report of *Escherichia fergusonii* in free-living white-faced whistling duck and white-necked hawk.

Key words: MALDI-TOF MS, microbiology, virulence, bacterial resistance, birds

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfis genotípicos de *Escherichia fergusonii* isoladas de irerês determinados pelo AFLP.

Figura 2. Perfis genotípicos de *Escherichia fergusonii* de isolados de aves silvestres e comerciais determinados pelo AFLP.

Figura 3. Perfis genotípicos de *Escherichia fergusonii* isoladas de galinhas determinados pelo AFLP.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostragem das aves utilizadas para isolamento de *Escherichia fergusonii*. São Paulo, 2018.

Tabela 2. Fatores de virulência, sequência de *primers* e temperatura de anelamento.

Tabela 3. Genes de beta-lactamases, sequência de *primers* e tamanho do amplicon (pb).

Tabela 4. Sequência de *primers*, tamanho dos produtos e referência dos genes plasmidiais de resistência às quinolonas.

Tabela 5. Perfil de sensibilidade de estirpes de irerês de vida livre

Tabela 6. Genes de virulência pesquisados em estirpes de irerês pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Tabela 7. Sítios de isolamento de *Escherichia fergusonii*

Tabela 8. Valores da CIM, beta-lactamases, genes de resistência às quinolonas (PMQR) e mutações em *gyrA* e *parC* em dois isolados multirresistentes de *E. fergusonii*

Tabela 9. Perfil de sensibilidade de estirpes de galinhas

Tabela 10. Genes de virulência pesquisados em estirpes de galinhas pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

LISTA DE ABREVIações

AD – Adesão Difusa

AFLP – Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados

AMC – Amoxicilina com ácido clavulânico

AMI – Amicacina

AMP – Ampicilina

APEC – *Escherichia coli* patogênica aviária

astA - EAST1 – Toxina termolábel de *Escherichia coli* enteroagregativa

BEM – Eozina Azul de Metileno

CFO – Cefoxitina

CLED – Agar de cistina lactose deficiente em eletrólitos

CLO – Cloranfenicol

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute

CMI – Concentração Mínima Inibitória

cnf – Fator necrotizante citotóxico

CRO – Ceftriaxona

CTX – Cefotaxima

cvl/cva – Operons relacionados ao plasmídeo de colicina

DAEC – *Escherichia coli* de aderência difusa

DEC – *Escherichia coli* diarreiogênica

EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa

EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasiva

ENO – Enrofloxacin

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica

ESBL – beta-lactamase de espectro estendido

ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica

ExPEC – *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

fyu – Yersiniabactina

GEN – Gentamicina

hlyA/hlyD/hlyE – Hemolisinas

iroN – gene de captura de ferro

irp – Yersiniabactina

irp2 – Proteína repressora de ferro

iss – Proteína de aumento da resistência ao sistema complemento

iuc/iucD – aerobactina

ITU – Infecção do Trato Urinário

LT – Toxina Termolábel

MALDI-TOF MS – *Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization*

MENEC – *Escherichia coli* associada a meningite neonatal

NAL – Ácido Nalidíxico

NCBI – National Center for Biotechnology Information

PAIs – Ilhas de Patogenicidade

papC – Gene codificador de Fímbria P

PCR – Reação em Cadeia pela ação da Polimerase

R – Resistente

S – Sensível

SHU – Síndrome Hemolítica Urêmica

ST – Toxina termo-estável

SUT – Sulfametoxazol-trimetoprim

STEC – *Escherichia coli* produtoras de toxina *Shiga*

TIO – Ceftiofur

TSA – Difco Bacto Tryptic Soy Agar

tsh – Hemaglutinina termo-sensível

UPEC – *Escherichia coli* uropatogênica

UPGMA – Unweighthed Pair-Group Methods Using Arthemic Average

vat – Toxina vacuolizante

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Família Enterobacteriaceae.....	19
2.2	Gênero <i>Escherichia</i>	20
2.2.1	<i>Fatores de virulência de APEC.....</i>	<i>23</i>
2.3	<i>Escherichia fergusonii.....</i>	<i>26</i>
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivos específicos.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	Estirpes bacterianas.....	31
4.2	Isolamento e identificação bacteriana.....	33
4.3	Determinação da Resistência aos Antimicrobianos.....	34
4.4	Determinação da produção de Hemolisinas em ágar Sangue.....	34
4.5	Pesquisa de genes de virulência pela PCR.....	34
4.6	Pesquisa de genes codificadores de beta-lactamase e PMQR pela PCR.....	37
4.7	Amplificação e sequenciamento de <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	39
4.8	Análise Filogenética por Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados – AFLP.....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1	Caracterização de virulência e resistência de <i>E. fergusonii</i> em irerês de vida livre em rota de migração na cidade de São Paulo.....	42
5.2	Caracterização de virulência e resistência de <i>E. fergusonii</i> em aves silvestres cativas.....	47
5.3	Caracterização de virulência e resistência de <i>E. fergusonii</i> em galinhas em sistema de criação comercial convencional e sistema orgânico no estado de São Paulo, Minas Gerais e Paraná.....	52
6	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

Escherichia fergusonii (*E. fergusonii*) é uma das seis espécies que compõem o gênero *Escherichia*. A bactéria foi descrita como uma nova espécie por William H. Ferguson em 1985, após o isolamento do agente em sangue de paciente humano (Farmer et al., 1985). Assim como os demais membros da Família Enterobacteriaceae, *E. fergusonii* se caracteriza pela forma de bacilos curtos Gram negativos (Gaastra et al., 2014). É um agente anaeróbico facultativo, oxidase negativo e apresenta capacidade de fermentar vários substratos, mas bioquimicamente se diferencia da maioria das estirpes de *Escherichia coli* (*E. coli*) pela incapacidade de fermentar a lactose e o sorbitol (Mahapatra et al., 2005). A diferenciação bioquímica entre as estirpes de *E. fergusonii* e *E. coli* na rotina laboratorial pode ser difícil; e métodos moleculares têm sido descritos com finalidade de diagnóstico diferencial rápido (Simmons et al., 2014).

E. fergusonii é considerada um patógeno emergente na medicina e a infecção de humanos tem sido associada a quadros de diarreias, infecções localizadas (principalmente feridas cutâneas) e infecções do trato urinário (ITU) (Gaastra et al., 2014). Quadros mais graves, de colangio-sepse, têm sido descritos na medicina, em pacientes com carcinoma de pâncreas (Funke et al., 1993). Pleurites e infecções sistêmicas têm sido associadas às estirpes com determinantes de virulência (Savini et al., 2009; Simmons et al., 2016). Uma preocupação adicional nestas infecções reside no fato das estirpes de *E. fergusonii* apresentarem resistência à diversas classes de antimicrobianos, dificultando o tratamento de ITUs e outras infecções localizadas e sistêmicas (Gaastra et al., 2014; Wragg et al., 2009).

Na medicina veterinária existem relatos de infecções por *E. fergusonii* em bovinos e ovinos, relacionados com manifestações clínicas que incluem abortamento, vasculite e mamite (Rimoldi; Moeller, 2013). A evolução da doença nos animais é aguda e pode resultar em óbito (Fegan, 2006). *E. fergusonii* também pode ser isolada em alimentos de origem animal, como carne e queijo (Rimoldi; Moeller, 2013), representando um risco à saúde pública.

A infecção por *E. fergusonii* tem sido relatada em algumas espécies de aves. Em avestruzes a infecção está melhor documentada e nestas aves o patógeno pode causar morte aguda após um quadro de anorexia, prostração e severa diarreia hemorrágica (Barnes; Nolan; Vaillancourt, 2008). As lesões mais frequentemente observadas nestas aves são peritonite fibrinosa e hemorragias multifocais (Wragg et al., 2009). Relatos pontuais de isolamento do agente em aves assintomáticas sugerem que algumas espécies possam atuar como reservatórios de *E. fergusonii* (Vaz et al., 2015).

Apesar da existência de alguns relatos na literatura, notadamente existe uma escassez de dados sobre a distribuição, virulência e resistência antimicrobiana de *E. fergusonii* em aves no Brasil e no mundo. Os avanços nas técnicas de diagnósticos com os protocolos de reação em cadeia pela ação da polimerase (PCR) e o uso da espectrometria de massa - MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) contribuíram para o aumento do número de relatos e estudos sobre o agente. De acordo com a base de dados de publicações médicas do NCBI (National Center for Biotechnology Information - PubMed), nos primeiros 10 anos após a descrição do agente foram publicados apenas nove artigos científicos sobre o tema. Na última década, no entanto, foram publicados 51 trabalhos que utilizam o nome do agente como palavra-chave. Apesar deste aumento, o número de publicações é inexpressivo se comparado com a frequência de publicações relativas à espécie *E. coli* (total de 113.921 artigos no mesmo período).

Em função da importância médica do agente e da escassez de dados, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de *E. fergusonii* em aves comerciais e silvestres (cativas e de vida livre), avaliando os determinantes de virulência e resistência antimicrobiana dos isolados.

2.1. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae constitui o grupo mais comum de bacilos Gram-negativos. Apresentam-se como bacilos curtos, imóveis ou móveis pela presença de flagelo peritríquio; aeróbios ou anaeróbios facultativos, com crescimento abundante em meios de peptona ou extrato de carne sem acréscimo de suplementos como cloreto de sódio (Sussman et al., 1997). Crescem em meios seletivos como ágar MacConkey, ágar Eosina Azul de Metileno (BEM), ágar Hoekten, ágar Verde Brilhante e ágar CLED (Ferreira; Knöbl, 2009). Nos testes bioquímicos se diferenciam pela fermentação de glicose e produção de gás, são catalase-positivos e oxidase-negativos e reduzem nitrato a nitrito (Jawetz et al., 2012).

A família possui distribuição mundial, habitando o trato gastrointestinal de humanos e animais, com distribuição ubiquitária pelo solo, vegetação e água. A família Enterobacteriaceae inclui mais de 50 gêneros definidos, que podem ser agrupados em três categorias: patógenos principais, patógenos oportunistas e não-patogênicos (Quinn et al., 2005). Dentre os agentes considerados patógenos principais ou oportunistas, as espécies de enterobactérias mais frequentemente isoladas de aves são: *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. e *Escherichia coli* (Cunha et al., 2017; Davies et al., 2016; Sanches et al., 2017). Todas estas gêneros e espécies de enterobactérias são considerados potencialmente zoonóticos (Benskin et al., 2009; Gioia-DiChiacchio et al., 2016).

As infecções causadas por bactérias da Família Enterobacteriaceae se destacam como as principais causas de óbito na classe das aves (Sanches et al., 2017). Estes agentes são considerados parte da microbiota intestinal de mamíferos e de algumas espécies de aves; e são capazes de se propagar no ambiente dos criatórios (Mattes et al., 2005). Em vida livre, psitacídeos e passeriformes não possuem enterobactérias na microbiota intestinal (Saidenberg et al., 2012). No entanto, dependendo das condições de biossegurança, a manutenção destas ordens de aves em cativeiro é capaz de modificar a microbiota intestinal, favorecendo a colonização por patógenos Gram-negativos (Mattes et al., 2005). Aves cativas podem atuar como reservatório de estirpes de enterobactérias virulentas e multirresistentes,

principalmente *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (Gyles; Fairbrother, 2010; Martins et al., 2015).

2.2 Gênero *Escherichia*

O gênero *Escherichia* é composto por seis espécies: *Escherichia albertii*, *Escherichia blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. vulneris* e *E. coli* (Burgess et al., 1973; Brenner et al., 1982a; Brenner et al., 1982b; Farmer et al., 1985; Sussman, 1997; Huys et al., 2003). O potencial zoonótico destas estirpes é reconhecido pela literatura mundial e os quadros humanos estão associados à mortalidade infantil por diarreia, em países em desenvolvimento (Tsiodras et al., 2008) e infecções em sítios extra-intestinais (Forgetta et al., 2012).

Escherichia coli é a espécie isolada mais comumente em humanos e animais (Gaastra et al., 2014), sendo também a de maior importância na medicina humana e veterinária (Trabulsi; Alterthum, 2008). A identificação da espécie *E. coli* é normalmente realizada por testes bioquímicos, devido as suas características de fermentação de lactose (>90%) e produção de indol (99% das estirpes) (Trabulsi et al., 2002).

O agente foi descrito em 1885, pelo pediatra alemão Theodor Escherich, e inicialmente denominado *Bacterium coli commune*, por ter sido isolado em crianças recém-nascidas saudáveis (Smith; Fratamico; Gunther, 2007). Posteriormente foram descritos os patótipos diarreiogênicos denominados DEC (*Diarrheagenic E. coli*) e os patótipos associados às infecções extra-intestinais (Nataro; Kaper, 1998).

O agente é facilmente encontrado no trato gastrointestinal e pode estar relacionado com quadros de doença de acordo com o seu sorotipo e hospedeiro, sendo mais frequente em animais jovens, em época de desmame, ou imunossuprimidos (Wray; Woodward, 1997). As manifestações clínicas da colibacilose dependem do sítio de infecção e dificilmente são diferenciadas de outras infecções bacterianas pelos sinais e manifestações clínicas (Jawetz et al., 2012).

A presença de marcadores genéticos, que atuam como determinantes de virulência, permite agrupar *E. coli* em diversas linhagens patogênicas e comensais. Entre as patogênicas, o grupo DEC abriga seis patotipos distintos (Nataro; Kaper, 1998):

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) é caracterizada pela presença do gene *eae* e ausência de genes relacionados com a produção de toxinas (Nataro; Kaper, 1998). Este patotipo promove uma aderência íntima da bactéria aos enterócitos com a formação de um pedestal, após a alteração dos filamentos de actina, facilitando a penetração de células bacterianas pela mucosa. A perda de vilosidades intestinais resulta na diminuição da superfície de absorção do jejuno e íleo, causando diarreia com eliminação de muco. Estirpes de EPEC típicas possuem um plasmídeo EAF, que codificam as fímbrias do tipo *bundle* (gene *bfp*). Já as estirpes de EPEC atípicas possuem o gene *eae*, mas não possuem o plasmídeo EAF (Williams et al., 1997).

E. coli enterotoxigênica (ETEC) adere as células epiteliais do intestino delgado, causando um quadro de diarreia em humanos e em animais, principalmente em leitões na fase pós-desmame (Nataro; Kaper, 1998; Sojka, 1972). O mecanismo de ação se deve à produção de enterotoxinas do tipo termolábel (LT) e termo-estável (ST). As toxinas causam diarreia osmótica devido à hipersecreção de íons e redução de absorção de água pelas células. A fixação ao epitélio é mediada pela expressão de diversos fatores de colonização, codificados por genes cromossomais ou plasmídeos (Quinn et al, 2005).

E. coli produtoras de toxina *Shiga* (STEC) está intimamente ligada com saúde pública, envolvidas a surtos de doenças transmitidas por alimentos de origem animal contaminados (Carvalho et al., 2012), caracterizados por diarreia de intensidade leve a moderada ou diarreia sanguinolenta e sintomatologia extra-intestinal, como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), falência renal e púrpura trombocitopênica (Caldorin et al., 2013). Esse patotipo pode ser dividido em STEC, a qual se refere a estirpes produtoras da toxina *Shiga* 1 e/ou 2 e EHEC, um subgrupo de STEC, capaz de produzir a toxina e levar a quadros mais severos de lesões histopatológicas com formação de pedestal (lesão *attaching and effacing*) (Rodrigues et al., 2008; Melton-Celsa, 2014).

E. coli enteroagregativa (EAEC), cujos determinantes de virulência ainda não foram completamente estabelecidos, mas fenotipicamente é caracterizada por um padrão organizado de aderência em células, além da elevada capacidade de formar biofilme *in vitro* e *in vivo*. A colonização do intestino delgado pode causar quadros agudos ou crônicos de diarreia, com má absorção de nutrientes e a produção de toxinas pode resultar em necrose de enterócitos (Jawertz et al., 2012).

E. coli de aderência difusa (DAEC) possui um padrão de adesão celular capaz de envolver a célula por completo, denominada adesão difusa (AD) (Nataro; Kaper, 1998). A sintomatologia das diarreias por DAEC é variável e a patogenia das infecções não está completamente definida. Porém os achados podem estar relacionados a quadros de diarreia em crianças maiores de 12 anos (Focaccia, 2005), o que raramente ocorre nas infecções por EPEC e ETEC.

E. coli enteroinvasiva (EIEC) causa doença em humanos, após invadir e multiplicar-se nas células epiteliais da mucosa intestinal, levando a um quadro de diarreia grave (Nataro; Kaper, 1998).

Os patotipos associados a infecções extra-intestinais, denominados ExPEC (*extraintestinal pathogenic E. coli*) incluem *E. coli* associada à meninge neonatal (MENEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* patogênica aviária (APEC) (Croxen, Finlay, 2010; Clemets et al, 2012; CDC, 2014).

Os marcadores de virulência de MENEC são cápsula do tipo K1, fímbria S, proteína *lbeA*, hemolisina, aerobactina e toxina CNF. Este patotipo é responsável pela ocorrência de meningite em crianças recém-nascidas em todo o mundo, associado frequentemente com a infecção por bactérias dos sorogrupos O1, O6, O7, O16, O18 e O83 (Ferreira; Knöbl, 2009).

A infecção por *E. coli* é também a causa mais comum de infecções urinárias em fêmeas de várias espécies, devido aos fatores de virulência, das estirpes que facilitam a colonização e a infecção, causando manifestações clínicas de poliúria, disúria, hematúria e piúria (Sussman, 1997). *E. coli* uropatogênica (UPEC) possui diversos marcadores de virulência, principalmente adesinas como Fímbria Tipo 1, fímbrias P e S, que facilitam a colonização ascendente do trato urinário. A presença do agente e a produção de toxinas do tipo CNF, hemolisinas e

endotoxina provocam reações inflamatórias locais nos processos de cistite e pielonefrite (Quinn et al, 2005). A migração de células inflamatórias causa dano epitelial, com invasão das células e formação de corpúsculos bacterianos intracelulares, favorecendo a persistência do agente e os quadros de recidiva da infecção (Viera, 2009).

O patotipo de ExPEC de maior impacto na medicina veterinária, no entanto, é a *E. coli* patogênica aviária (APEC). Este grupo possui grande significância para o mercado econômico devido aos prejuízos associados com os gastos relacionados ao controle da enfermidade e a condenação de carcaças em abatedouros (Barnes et al., 2008; Ferreira; Knöbl, 2009).

Estirpes patogênicas de *E. coli* aviária causam enfermidades infecciosas, localizadas ou sistêmicas, que acomete aves jovens, sendo mais comum em aves de produção. *Escherichia coli* atua como um agente oportunista, e pode levar ao quadro de septicemia, aerossaculite, peritonite, onfaloflebite, granuloma hepático (Coelho, 2004), salpingite, orquite e enterite (Barnes; Nolan; Vaillancourt, 2008). Nas aves, a porta de entrada da infecção é o trato respiratório superior, com colonização e multiplicação bacteriana na traqueia, e posterior disseminação para os sacos aéreos e órgãos adjacentes como fígado e coração (Dho-Moulin; Fairbrother, 1999; Barnes; Nolan; Vaillancourt, 2008). Os sorogrupos O1, O2, O21, O36, O45, O78 são os mais prevalentes em aves comerciais no Brasil (Ferreira; Knöbl, 2009).

2.1.1. Fatores de Virulência de APEC

APEC são um subgrupo das linhagens extra-intestinais - ExPEC, e possuem uma grande variedade de fatores de virulência e resistência a antimicrobianos, além de uma boa adaptação ao hospedeiro. APEC compartilha alguns fatores de virulência de UPEC e MENECA, tais como presença de antígeno capsular, produção de colicina e aerobactina e toxina cnf, entre outros (Barnes; Vaillancourt; Gross, 2008). Esta similaridade genética entre APEC e ExPEC sugere um potencial risco zoonótico do agente (Cunha et al., 2017).

A classificação de estruturas antigênicas (O:K:H), a inoculação em animais e as técnicas fenotípicas de hemaglutinação, aderência em cultura de células, detecção de toxinas e hemolisinas podem ser utilizadas para a classificação de estirpes de APEC (Barnes; Nolan; Vaillancourt, 2008). No entanto, o uso de técnicas de biologia molecular possui vantagens na caracterização da virulência, por ter maior rapidez, menor custo e possibilidade mais ampla de analisar a combinação dos determinantes de virulência (Ewers et al., 2004; Johnson et al., 2008; Schouler et al., 2012).

Adesinas, cápsulas, toxinas, evasinas, invasinas e sistemas de captação de ferro estão entre os principais fatores de virulência presentes em APEC (Barnes; Nolan; Vaillancourt, 2008). As adesinas recobrem a superfície bacteriana e podem ser fimbriais ou não-fimbriais. Elas são capazes de reconhecer receptores específicos na superfície da célula do hospedeiro, favorecendo a colonização de tecidos e a multiplicação do patógeno (Dho-Moulin; Fairbrother, 1999).

As adesinas mais comumente encontradas em APEC são as fimbria Tipo I, fimbria P, fimbria S e curli. A fimbria tipo I favorece a colonização do epitélio do trato respiratório devido a aderência ao muco. São comumente encontradas em enterobactérias, e aderem facilmente às células da faringe e traqueia (Barnes; Nolan; Vaillancourt, 2008), e são caracterizadas pela capacidade de hemaglutinar hemácias de galinhas e cobaias (Monroy et al., 2005).

A fimbria P é uma adesina-hemaglutinina manose resistente e está intimamente relacionada com infecção do trato urinário e sepse (Cunha, 2014). A fimbria S também é uma adesina-hemaglutinina manose resistente, mas possui afinidade aos receptores de ácido siálico, favorecendo a aderência da bactéria em linhagens de células endoteliais e epiteliais do plexo coroide e ventrículo cerebral, associada aos casos de meningite de recém-nascidos (Klemm, 1994). Curli são adesinas curtas que não aglutinam hemácias, mas podem contribuir para a invasão em células eucarióticas, favorecendo a aderência da bactéria em fibronectina, laminina e superfícies abióticas, estimulando a formação de biofilmes (Dho-Moulin; Fairbrother, 1999).

Algumas proteínas de membrana externa podem auxiliar no processo de aderência bacteriana, atuando também como invasinas por facilitarem a invasão da célula do hospedeiro, por meio da fagocitose (Sircili; Trabulsi, 2005). O gene *ibeA* presente em algumas estirpes de ExPEC codifica uma invasina essencial na invasão

de células microvasculares, desempenhando papel importante na patogenia da meningite neonatal humana (Germon et al., 2005). Em APEC, está relacionada com a alta patogenicidade (Germon et al., 2005; Moulin-Schouler et al., 2006; Vidotto et al., 2007; Cortes et al., 2008; Mora et al., 2010; Wang et al., 2011, 2012; Johnson et al., 2012a; Barbieri et al., 2013, Cunha, 2014).

As evasinas são fatores de virulência utilizados para driblar mecanismos de defesa como fagocitose, sistema complemento, citocinas, linfócitos e anticorpos (Sircili; Trabulsi, 2005), e permitem que alguns microrganismos resistam aos fatores séricos inibitórios do hospedeiro (Knöbl, 2016). Proteínas traT, iss e ompT estão entre os principais componentes bacterianos envolvidos na resistência sérica (Barnes; Nolan; Vaillancourt, 2008).

A multiplicação bacteriana depende da disponibilidade de ferro no hospedeiro, podendo ser afetada devido à escassez em sua forma livre no organismo. Na busca de ferro, algumas bactérias sintetizam e secretam moléculas com alta afinidade por ferro, denominadas sideróforos (Adler et al., 2012). Estirpes de APEC podem expressar diversos sideróforos, sendo os mais comumente encontrados os sideróforos do tipo aerobactina (*iuc*), yersiniabactina (*fyu* e *irp2*) e salmochelina (*iro*) (Cunha, 2014).

A prevalência dos genes codificadores de proteína como o fator necrotizante citotóxico (*cnf*), alguns tipos de hemolisinas (*hlyA*, *hlyD*, *hlyE*) e toxina vacuolizante (*vat*) é menos frequente em APEC, sendo estes fatores de virulência mais relacionados aos isolados humanos de UPEC e MENECA (Barnes; Nolan; Vaillancourt, 2008).

Segundo Dho-Mulin e colaboradores (1999) a patogenicidade de uma estirpe não deve ser avaliada somente na presença ou ausência de genes, pois depende da combinação de vários determinantes de virulência. De acordo com Tivendale e colaboradores (2004), estirpes aviárias mais virulentas possuem a associação dos genes *iss* e *iuc*, relacionados à resistência sérica e captura de ferro, respectivamente.

Diversos protocolos de classificação por marcadores ideais têm sido propostos. Segundo Ewers e colaboradores (2005), uma estirpe pode ser considerada patogênica, quando possui ao menos 4 dos seguintes genes: *papC* (fimbria P), *iucD*

(aerobactina), *irp2* (proteína repressora de ferro), *tsh* (hemaglutinina termo-sensível), *vat* (toxina vacuolizante), *astA* (EAST1 – toxina termo lábil de *E. coli* enteroagregativa), *iss* (proteína de aumento da resistência ao sistema complemento) e *cvi/cva* (operons relacionados ao plasmídeo de colicina – pColV). A presença de genes relacionados ao plasmídeo de colicina são mais prevalentes em estirpes de APEC, quando comparado a UPEC e MNEC (Ewers et al, 2007).

2.1.2. *Escherichia fergusonii*

E. fergusonii foi descrita por William H. Ferguson em 1985 e associada a doença tanto em animais quanto em humanos, sendo considerada um patógeno emergente na atualidade (Gaastra et al, 2014; Wragg et al., 2009). O agente pode ser isolado de fezes de pacientes com diarreia, feridas cutâneas, urina e sangue e pleura (Gaastra et al., 2014). Sua presença, na medicina humana, tem sido descrita com maior frequência em pacientes com carcinoma de pâncreas, episódios de colangio-sepse (Funke et al., 1993), infecção no trato urinário, pleurite e também em sepse (Savini et al., 2009).

Na medicina veterinária os relatos são mais escassos e incluem o isolamento de animais doentes e de produtos de origem animal, tais como carne e queijo (Rimoldi e Moeller, 2013). Os achados de infecção em ruminantes (bovinos e ovinos) incluem abortamento, vasculite e mamite (Rimoldi e Moeller, 2013), com manifestações clínicas e evolução semelhantes aos quadros de salmonelose (Bain; Green, 1999; Fegan et al., 2006). Em avestruzes, a infecção por *E. fergusonii* causa sintomatologia inespecífica, com anorexia, prostração, eriçamento de penas e diarreia hemorrágica, seguida de sepse (Barnes; Nolan; Vaillancourt, 2008). As lesões descritas nestas aves incluem peritonite fibrinosa e hemorragias multifocais. Em animais mortos é possível isolar o agente em sangue, fígado e baço (Wragg et al., 2009).

E. fergusonii é uma bactéria gram-negativa, oxidase negativa, catalase positiva e geralmente móvel. Apresenta forma de bastonete, com diâmetro em torno de 0.8-1.5µm. É um anaeróbio facultativo, positivo para produção de indol, lisina descarboxilase e ornitina descarboxilase. As colônias são fermentadoras de maltose, D-glucose com produção de gás e negativas para fosfato alcalino, *beta*-D-glucosidase

e *beta*-xilosidase. Quanto à presença de *beta*-galactosidade e fermentação de lactose e D-manose são variáveis (Savani et al., 2008). São negativas para Voges-Proskauer e não utilizam citrato; não fermentam lactose, sucrose e D-sorbitol (Farmer et al., 1985).

E. fergusonii apresenta 64% de similaridade genética com *Escherichia coli*, embora o diagnóstico bioquímico diferencial em laboratório possa ser difícil (Farmer et al., 1985). Trabalhos anteriores relatam a identificação errônea de estirpes devido às semelhanças morfológicas e bioquímicas entre as duas espécies. Em um estudo realizado por Crawford-Miksza e colaboradores (2009), utilizando Vitek 2 Compact foi possível observar 99% de erro de identificação em estirpes de *E. fergusonii*, classificadas como *E. coli*. Segundo Smajs e colaboradores (2003), além da similaridade entre estirpes de *Escherichia coli*, *E. fergusonii* também tem sido confundida com *Shigella* sp.

Para a diferenciação bioquímica de *E. fergusonii* e *E. coli* a literatura sugere o uso de ágar citrato adonitol e ágar MacConkey sorbitol (Simmons, 2014). A utilização de meios cromogênicos pode facilitar a diferenciação, uma vez que *E. fergusonii* cresce como colônias rosas com descoloração em tom marrom ao redor no Chromo ágar Orientation. Outra metodologia utilizada para o diagnóstico diferencial é o uso de sonda marcada com corante fluorescente. Porém essa técnica é restrita apenas para a identificação das espécies *E. fergusonii*, *E. coli* e *Shigella* spp. (Glover et al., 2017).

A utilização de técnicas convencionais para a identificação do agente limita uma identificação acurada, devido a isso, estudos anteriores mostraram que métodos moleculares podem ser mais rápidos e específicos na identificação de *E. fergusonii* (Simmons et al., 2016). Smajjs e colaboradores (2002) propuseram a relação de genes de virulência *iucABCD* e *iutA* como marcadores associados com a presença de aerobactina e sistema de captação de ferro em estirpes de *E. fergusonii*. Segundo de Lorenzo e Martinez (1988), a localização dos genes é cromossomal, intercalado dentro de regiões associadas com ilhas de patogenicidade (PAIs).

E. fergusonii tem a capacidade de carrear vários genes de virulência presentes em plasmídeos de estirpes de DEC e ExPEC (Simmons et al., 2016). Oh e colaboradores (2012) observaram a presença de genes que codificavam a produção da toxina LT em estirpes virulentas de *E. fergusonii*.

A presença de fimbrias em amostras de *E. fergusonii* ainda não está bem documentada, embora o aparecimento do gene *prfB* tenha envolvimento com a regulação e expressão de genes fimbriais do tipo I e fimbria P. A presença de genes regulatórios em estirpes de *E. coli* está bem definida, e em estirpes de *E. fergusonii* pode sugerir uma função similar (Wragg et al., 2009). Segundo Wragg e colaboradores (2009), o estudo demonstrou a presença de fimbria tipo I em estirpes de *E. fergusonii*, desempenhando a função de adesão em células HEp-2, testadas na presença de manose. Os autores relatam ainda que a ausência de genes de aderência descritos em *E. coli* em algumas estirpes aderentes de *E. fergusonii* sugere a utilização de outros mecanismos indefinidos que permitem a colonização tecidual (Wragg et al., 2009).

A falta de informações não está restrita aos dados de virulência e também envolve os mecanismos de resistência antimicrobiana em estirpes de *E. fergusonii*. Neste contexto, é possível supor que a pressão de seleção exercida pelo uso dos antibióticos na cadeia de produção animal possa contribuir para a seleção de estirpes com resistência múltipla aos antimicrobianos, permitindo a disseminação horizontal de elementos móveis (plasmídeos, transposons e integrons) nos sistemas de produção de frangos e galinhas (Forgetta et al., 2012; Gaastra et al, 2014; Simmons et al, 2016).

Segundo Simmons e colaboradores (2016), o estudo feito para avaliar a presença de resistência em estirpes de *E. fergusonii* revelou a distribuição do fenótipo de resistência a ampicilina, estreptomicina e tetraciclina, em 75,1%, 62,9% e 57,1% das estirpes isoladas de aves, respectivamente; além de um baixo percentual de isolados de resistentes a ceftriaxona. Embora a sensibilidade a outros antimicrobianos testados tenha sido observada, houve um alto percentual de amostras intermediárias a azeotreonam, canamicina e estreptomicina (Simmons et al., 2016).

Comumente, os gêneros da família Enterobacteriaceae são produtores de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e as estirpes possuem mecanismos de disseminação e aquisição de plasmídeos de resistência devido a transferência de elementos móveis horizontalmente (Carattoli, 2013). Em outro estudo, feito por Rayamajhi e colaboradores (2011), utilizando estirpes de origem suína, foi observado um alto índice de isolados multirresistentes em amostras de fezes de animais doentes, sugerindo a presença do agente causando infecção em hospedeiros diferentes.

Lagacé-Wiens e colaboradores (2010) relataram a presença de estirpes de *E. fergusonii* ESBL em paciente humano com cistite, apresentando dificuldade no tratamento. Bours e colaboradores (2010), avaliaram o perfil de susceptibilidade de 10 estirpes de *E. fergusonii* de origem humana e constataram sensibilidade de 6/10 isolados testados, sendo os outros quatro classificados com perfil de resistência intermediária aos antimicrobianos testados.

A existência de estirpes de *E. coli* com fenótipo ESBL é bem documentada pela literatura médica e tornou-se uma preocupação para a saúde pública e principalmente para a indústria alimentícia (Ferreira et al., 2016). Segundo Liebana e colaboradores (2013), as razões para maior preocupação são devido a seleção de isolados resistentes consequente ao uso indiscriminado de antibióticos e a presença de elementos móveis carreando possíveis genes de resistência para diferentes hospedeiros. Em um estudo realizado por Ferreira e colaboradores (2016) foi avaliada a presença de ESBL em estirpes de *E. fergusonii*, relevando dois achados de CTX-M-2 provenientes de galinhas de produção do estado de São Paulo, com alto potencial patogênico.

3.1. OBJETIVOS

Investigar a presença de *Escherichia fergusonii* em aves comerciais e silvestres (de vida livre e cativas)., e avaliar a presença dos determinantes de virulência e resistência aos antimicrobianos.

3.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar a presença de *Escherichia fergusonii* em irerês (*Dendrocygna viduata*) de vida livre, em rota de migração no Estado de São Paulo;

Investigar a presença de *Escherichia fergusonii* em aves silvestres cativas das ordens passeriformes, psittaciformes, accipitriformes, strigiformes e falconiformes;

Investigar a presença de *Escherichia fergusonii* em galinhas domésticas (*Gallus gallus*) criadas em sistemas convencionais e orgânicos;

Avaliar a susceptibilidade antimicrobiana dos isolados;

Determinar a produção de hemolisina em ágar sangue;

Avaliar a presença de fatores de virulência de DEC e ExPEC por meio da pesquisa dos genes *iroN*, *cvi*, *cva*, *astA*, *tsh*, *irp*, *usp*, *vat*, *eae*, *ipaH*, *aggR*, *ibeA*, *hly*, *iutA*, *cnf*, *ompT*, *LT*, *STa*, *STb*, *stx1* e *stx2*;

Realizar uma análise filogenética por meio da técnica de AFLP.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estirpes bacterianas

Para este estudo foram coletadas amostras de três grupos distintos, incluindo aves comerciais, aves silvestres de vida livre e aves silvestres cativas, conforme ilustra a Tabela 1.

Aves silvestres de vida livre

Amostras de cloaca e orofaringe de 49 irerês (*Dendrocygna viduata*) foram coletadas no mês de agosto de 2016, na região Sul de São Paulo, precedendo o período de migração (Licença SISBIO: 47812-1). O material foi coletado com suabes estéreis, contendo meio de transporte Stuart, e mantidos sob refrigeração até o processamento.

Aves silvestres cativas

Amostras de cloaca e de orofaringe de aves cativas foram coletadas com suabes estéreis com meio de transporte Stuart, e mantidas sob refrigeração até o processamento. As aves selecionadas pertenciam às espécies mais comuns de apreensão do tráfico de animais selvagens e eram mantidas em centros de triagem, criatórios conservacionistas e zoológicos, com tempo de cativeiro superior a 30 dias. Os suabes foram coletados no período de Julho de 2011 a Abril de 2018 (Licença SISBIO: 46561-2). Da ordem Passeriformes foram coletadas 50 amostras da espécie *Sicalis flaveola flaveola* (canários-venezuelanos). Da ordem Psittaciformes foram coletadas 90 amostras dos gêneros *Amazona* spp. (papagaios) e *Ara* spp. (araras). Da ordem Accipitriformes foram coletadas 01 amostra de *Buteogallus lacernulatus* (Gavião- Pombo pequeno), 01 amostra de *Rupornis magnirostris* (Gavião Carijó), 03 amostras de *Parabuteo unicinctus* (Gavião Asa-de-Telha) e 03 amostras de *Geranoeetus albicaudatus* (Gavião de Cauda Branca). Da ordem dos Falconiformes

foram coletadas 06 amostras de *Falco sparverius* (Gavião Quiriquiri), 02 amostras de *Caracara plantus* (Gavião Caracara) e 01 amostra de *Falco femoralis* (Gavião-de-coleira). Da ordem Strigiformes foram coletadas 09 amostras de *Megascops choliba* (Coruja-do-mato) e 01 amostra de *Athene cunicularia* (Coruja-buraqueira).

Aves Comerciais

Amostras de cloaca e orofaringe de aves comerciais da espécie *Gallus gallus* (galinha doméstica) foram coletadas com suabes estéreis com meio de transporte Stuart, e mantidas sob refrigeração até o processamento. As aves selecionadas eram criadas em sistemas convencionais de poedeiras (n=55), orgânico (n= 100) e frangos de corte (n=60). (CEUA nº1299290616).

Tabela 1. Amostragem das aves utilizadas para isolamento de *E. fergusonii*. São Paulo, 2018.

Aves	Sistema de criação	Espécie	Número de amostras
Comerciais	Orgânicos	<i>Gallus gallus</i>	100
	Poedeiras	<i>Gallus gallus</i>	55
	Frangos de corte	<i>Gallus gallus</i>	60
Silvestres	Vida Livre	Anseriformes	49
		Passeriformes	50
	Cativos	Psittaciformes	90
		Accipitriformes	8
		Falconiformes	9
		Strigiformes	10

(Fonte: FRANCO, L.S. Dissertação, 2018)

4.2 Isolamento e Identificação bacteriana

Após a coleta, todas as amostras foram processadas e identificadas no Laboratório de Medicina Aviária da FMVZ-USP. As amostras foram semeadas em caldo BHI (Infusão de cérebro e coração, Difco™) e isoladas em ágar MacConkey, com incubação a 37°C por 24 horas. Após o isolamento, as colônias lactose-negativas foram estocadas e submetidas a identificação pela técnica de espectrometria de massa - MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of-Flight Mass Spectrometry*) (Kuhnert et al., 2015).

Para a identificação, as colônias estocadas foram semeadas em ágar TSA (Difco Bacto Tryptic Soy Agar) e incubadas a 37°C por 24 horas. Uma colônia deste cultivo foi adicionada em um eppendorf de 1,5mL contendo 300 µL de H2O MiliQ. Foram adicionados 900 µL de etanol absoluto para suspensão das bactérias e o eppendorf foi agitado e centrifugado por 2 minutos à 12.800xg, com descarte do sobrenadante. Foi feita uma secagem completa de 24 horas em temperatura ambiente, com posterior adição de 30 µL de ácido fórmico 70% e 30 µL de acetonitrila (100%). A mistura foi novamente centrifugada a 13.000xg por 2 minutos e o sobrenadante foi estocado a -20°C até o processamento final das amostras.

O teste foi realizado em espectrofotômetro de massa *Microflex™* (Burker Daltonik). Para a leitura, 1 µL de suspensão proteica foi transferido para a placa de aço inox polido de 96 poços. Após a secagem em temperatura ambiente foi adicionado sobre a amostra 1 µL da matriz (10 mg de ácido a-ciano-4-hidroxi-cinâmico ml-1 em acetonitrilo a 50% / ácido trifluoroacético a 2,5%). Cada estirpe foi distribuída em duplicata, com duas leituras por placa, para a captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa *FlexControl™* (Burker Daltonik) pelo método MTB_autoX.

A identificação bacteriana foi realizada com auxílio do programa *BioTyper™* (MALDI Biotyper CA Systems 3.0 Burker Daltonik), utilizando as configurações padrões, por meio da comparação dos espectros capturados com a biblioteca do fabricante. Os critérios de interpretação dos picos específicos de cada gênero e espécie bacteriana foram: ≥ 2.0 para atribuição de espécie, ≥ 1.7 e < 2.0 para atribuição de gênero.

As estirpes identificadas foram congeladas a -80°C em meio LB (Luria-Bertani) com glicerol e registradas na coleção de cultura do Laboratório.

4.3 Determinação da resistência dos antimicrobianos

O perfil de resistência bacteriana foi determinado utilizando-se a técnica de difusão em ágar com discos impregnados com antibióticos. A escolha dos antibióticos foi definida de acordo com as recomendações do protocolo M21-A3, documento emitido pela CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2013). Os agentes selecionados foram ácido nalidíxico - NAL, amicacina - AMI, ampicilina - AMP, amoxicilina com ácido clavulânico - AMC, cloranfenicol - CLO, ceftiofur - TIO, cefotaxima - CTX, cefoxitina - CFO, ceftriaxona - CRO, enrofloxacina - ENO, gentamicina - GEN, sulfonamida - SUL, tetraciclina - TET, sulfametoxazol-trimetoprim - SUT. As estirpes foram consideradas multirresistentes quando apresentada resistência a três ou mais classes de antimicrobianos distintos.

As estirpes que apresentaram genes codificadores de ESBL e PMQR foram submetidas à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando a metodologia de diluição em ágar conforme recomendações do CLSI. Os antibióticos testados e a extensão da CIM foram: Cefotaxima (0,03 – 64 mg/L), Ceftiofur (0,03 – 64 mg/L), Cefepima (0,03 – 64 mg/L), Ceftazidima (0,03 – 64 mg/L), Ciprofloxacino (0,03 – 64 mg/L), Enrofloxacino (0,03 – 64 mg/L), Marbofloxacino (0,03 – 64 mg/L) e Ácido nalidíxico (0,5 – 256 mg/L).

4.4 Determinação da produção de hemolisinas em ágar sangue

As estirpes de *Escherichia fergusonii* foram submetidas ao teste de produção de hemolisinas em ágar sangue. As estirpes foram semeadas em uma placa de ágar sangue de carneiro 5%. O resultado foi considerado positivo quando se observou uma zona de hemólise ao redor das colônias. Uma estirpe de *E. coli* Uropatogênica (UPEC) sorogrupo O6 foi utilizada como controle positivo do teste. *Escherichia coli* K 12 C600 foi utilizada como controle negativo para o teste.

4.5 Pesquisa de Genes de Virulência pela PCR

Todas as estirpes identificadas tiveram o DNA bacteriano purificado pela extração baseada nas propriedades de lise e inativação de nucleases do Tiocianato de Guanidina, junto às propriedades das partículas de terra diatomácea em ligar-se ao DNA ou RNA (Boom et al., 1990).

Após a extração do DNA, foi realizada a pesquisa dos genes de virulência: *iroN*, *cvi*, *cva*, *astA*, *tsh*, *irp*, *usp*, *vat*, *eae*, *ipaH*, *aggR*, *ibeA*, *hly*, *iutA*, *cnF*, *ompT*, *LT*, *STb*, *STa*, *stx1* e *stx2* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase chain reaction*), segundo a metodologia descrita por Cunha (2014). Os *primers* e as referências utilizadas estão descritos Tabela 2.

A amplificação foi realizada em termociclador (*Mastercycler Gradient, Eppendorf*). A mistura para a amplificação foi constituída por PCR buffer 1X, 1.5mM de MgCl₂, 0.2mM de Trifosfatos de desoxinucleotídeos, 10 picomols de cada primer, Taq DNA polimerase 0.5 U, água autoclavada ultrapura e 3 µL do DNA molde, em um volume final de 25 µL, como descrito por Yu e Kaper (1992) e Pal e colaboradores (1999). Os produtos da amplificação foram separados na eletroforese, em gel de agarose 1,5% e corados com *Gel Red* (*Biotium*, Hayward, CA, EUA). O marcador de peso molecular utilizado foi o 100-bp DNA *ladder* (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil). Foram utilizadas amostras de DNA genômico de referência para *Escherichia coli*.

Tabela 2. Fatores de virulência, sequência de *primers* e temperatura de anelamento.

Gene	Sequência de primers (5' 3')	Anelamento	Amplicon (bp)	Referência
<i>tsh</i>	GGGAAATGACCTGAATGCTGG CCGCTCATCAGTCAGTACCAC	60	420	Maurer et al., 1998
<i>iroN</i>	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT GTTCCGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	60	553	Johnson et al., 2006
<i>irp2</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	61	280	Schubert et al., 1998
<i>cvi/cva</i>	TCCAAGCGGACCCCTTATAG CGCAGCATAGTTCCATGCT	59	598	Ewers et al., 2007
<i>ibeA</i>	TGGAACCCGCTCGTAATATAC CTGCCTGTTCAAGCATTGCA	58	342	Ewers et al., 2004
<i>vat</i>	TCCTGGGACATAATGGTCAG GTGTCAGAACGGAATTGT	53	981	Ewers et al., 2004
<i>astA</i>	TGCCATCAACACAGTATATCC TAGGATCCTCAGGTCGCGAGTGACGGC	55	116	Yamamoto; Echeverria, 1996
<i>cnf1</i>	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG CATTGAGAGTCCTGCCCTCATTATT	61	498	Yamamoto et al., 1995
<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	60	302	Johnson et al., 2008
<i>ompT</i>	TCATCCCAGGAAGCCTCCCTCACTACTAT TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	60	496	Johnson et al., 2008
<i>hlyF</i>	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	60	450	Johnson et al., 2008
<i>usp</i>	ACATTCAACGGCAAGCCTCAG AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC	60	440	Bauer et al., 2002
<i>eae</i>	CATTGATCAGGATTTTCTGGT TCCAGAATAATATTGTTATTACG	55	510	Mora et al., 2012
<i>ipaH</i>	GCTGGAAAACTCAGTGCCT CCAGTCCGTAAATTCATTCT	63	424	Venkatesan et al., 1989
<i>aggR</i>	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	58	254	Toma et al., 2003
<i>LT</i>	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	45	696	Yavzori et al., 1998
<i>STa</i>	GTCAGTCAACTGAATCACTTGACTCT CATGGAGCACAGGCAGGATTACAACA	63	190	Zhang et al., 2007
<i>STb</i>	GCTACAAATGCCTATGCATCTACACA CATGCTCCAGCAGTACCATCTCTAAC	63	150	Zhang et al., 2007
<i>stx1</i>	AGCTGAAGCTTTACGTTTTCGGG TTTGCGCACTGAGAAGAAGAGA	62	590	Tsen & Jian, 1998
<i>stx2</i>	TTTCCATGACAACGGACAGCAGTT ATCCTCATTATACTTGGAAAACCTCA	62	694	Tsen & Jian, 1998

(Fonte: FRANCO, L.S. Dissertação, 2018)

4.6 Pesquisa de Genes codificadores de *beta*-lactamases e PMQR pela PCR

Após a extração do DNA, foi realizada a pesquisa dos genes codificadores de *beta*-lactamases, utilizando o protocolo proposto por Dallenne e colaboradores (2010); e genes plasmidiais de resistência às quinolonas conforme método descrito por Ciesielczuk e colaboradores (2013). Os *primers* utilizados estão descritos nas tabelas 3 e 4.

A amplificação foi realizada em termociclador (*Mastercycler Gradient, Eppendorf*). A mistura para a amplificação foi constituída por PCR buffer 1X, 1.5mM de MgCl₂, 0.2mM de Trifosfatos de desoxinucleotídeos, 10 picomols de cada primer, Taq DNA polimerase 0.5 U, água autoclavada ultrapura e 3 µL do DNA molde, em um volume final de 25 µL. Os produtos da amplificação foram separados na eletroforese, em gel de agarose 1,5% e corados com *Gel Red (Biotium, Hayward, CA, EUA)*. O marcador de peso molecular utilizado foi o 100-bp DNA *ladder* (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil). Foram utilizados controles positivos do banco de estirpes do Laboratório de Medicina Aviária.

Tabela 3. Genes de beta-lactamases, sequência de primers e tamanho do amplicon.

Grupos de beta-lactmase	Genes de beta-lactmase	Sequência de primers	Tamanho do amplicon (bp)
Ampla espectro e ESBL	TEM	CATTTCCGTGTGCCCTTATTC	800
		CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
	SHV	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	713
		ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
	OXA	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564
		GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	
ESBL	CTX-M-1	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688
		CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
	CTX-M-2	CGTTAACGGCACGATGAC	404
		CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
	CTX-M-9	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561
		TGATTCTCGCCGCTGAAG	
	CTX-M-8/25	AACRCRCAGACGCTCTAC	326
		TCGAGCCGGAASGTGTAT	
pAmpC	FOX	CTACAGTGCGGGTGGTTT	162
		CTATTTGCGGCCAGGTGA	
	DHA	TGATGGCACAGCAGGATATTC	997
		GCTTTGACTCTTTTCGGTATTCG	
	CMY	CAATGTGTGAGAAGCAGTC	1432
		CGCATGGGATTTTCCTTGCTG	

(Fonte: FRANCO, L.S. Dissertação, 2018)

Tabela 4. Sequência dos *primers*, tamanho dos produtos e referências dos genes plasmidiais de resistência às quinolonas.

Alvo	Sequência (5'-->3')	Amplicon (bp)	Referência
<i>qnrA</i>	F- CAGCAAGAGGATTTCTCACG	630	Ciesielczuk et al., 2013
	R- AATCCGGCAGCACTATTACTC		
<i>qnrB</i>	F- GGCTGTCAGTTCTATGATCG	488	Ciesielczuk et al., 2013
	R- GAGCAACGATGCCTGGTAG		
<i>qnrC</i>	F- GAGCAACGATGCCTGGTAG	118	Ciesielczuk et al., 2013
	R- SAKCAACGATGCCTGGTAG		
<i>qnrD</i>	F- GCAGAATTCAGGGGTGTGAT	581	Cavaco et al., 2009
	R- AACTGCTCCAAAAGCTGCTC		
<i>qnrS</i>	F- CGAGATCAATTTACGGGGAATA	428	Cattoir et al., 2007
	R- AACAAGCTGAAGCGCCTG		
<i>qepA</i>	F- GCAAGTTCATTGAACAGGGT	218	Yamane et al., 2008
	R- TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
<i>oqxAB</i>	F- GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	313	Ciesielczuk et al., 2013
	R- CTCCTGCCCCGAGTATCGTG		

(Fonte: FRANCO, L.S. Dissertação, 2018)

4.7 Amplificação e sequenciamento de *gyrA* e *parC*

Com o propósito de determinar a existência de mutações responsáveis por resistência às quinolonas, foram amplificados e sequenciados os genes *gyrA* e *parC*.

Para a amplificação dos genes correspondentes a DNA girase e topoisomerase foram utilizados os primers *GyrA1* 5'-CGACCTTGCGAGAGAAAT-3' e *GyrA2* 5'-GTTCCATCAGCCCTTCAA-3' e *ParC1* 5'-AGCGCCTTGCGTACATGAAT-3' e *ParC2* 5'-GTGGTAGCGAAGAGGTGGTT-3' conforme descrito por Mammeri e colaboradores (2005). A amplificação destes genes foi: desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 60 segundos, 55°C por 60 segundos e 72°C por 1 minuto. Os tamanhos esperados dos fragmentos amplificados foram 630 pb para *gyrA* e 940 pb para *parC*, respectivamente. Os fragmentos de DNA

amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado SyBR Safe® (Invitrogen, Brasil).

4.8 Análise filogenética por Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados (AFLP)

O AFLP (Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos Amplificados) foi realizado utilizando a endonuclease de restrição *Hind* III (sítio de restrição 5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5'), de acordo com o protocolo descrito por MClachlin et al. (2000). Para clivagem do DNA bacteriano, 4 µg de DNA foram adicionados a um microtubo contendo 24U de *Hind* III, tampão da enzima (1X) e água até o volume final de 20 µL.

O tubo foi incubado a 37°C por 4 horas. Após este período, uma alíquota de 5 µL do DNA clivado foi adicionado a um microtubo contendo 0,2 µg dos adaptadores ADH1 e ADH2 (ADH1 5'ACG GTA TGC GAC AG3' e ADH2 5'GAG TGC CAT ACG CTG TCT CGA3'), 1U de T4 DNA ligase, tampão ligase e água até o volume final de 20 µL. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. O DNA ligado foi aquecido a 80°C por 10 minutos para realização da PCR.

A PCR foi realizada utilizando-se 2 µL do DNA ligado diluído, 2,5 mM de MgCl₂, 300 ng do primer (HI-X), 1U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µL. Submeteu-se as amostras à desnaturação a 94°C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C e 2,5 minutos a 72°C. Realizou-se a detecção dos produtos de amplificação (20 µL produto e 5 µL de tampão de corrida 6X) através da eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

Os fragmentos amplificados foram visualizados no sistema de foto documentação *ImageMaster* (Amersham Biosciences), sendo os mesmos corados com *BlueGreen*® (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA *ladder* (LGC Biotecnologia).

Para análise estatística dos fragmentos gerados foi utilizado o programa *Bionumerics* (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgica). A similaridade das

amostras foi estimada por meio do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada foi possível determinar os grupos pelo método de "*Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average*" (UPGMA).

Foi utilizado o ponto de corte de 90% de similaridade genética para definição os perfis genotípicos (Van Belkun et al., 2007). Os resultados obtidos através da caracterização genotípica foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter; Gaston (1988), para determinação do índice discriminatório.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização de virulência e resistência de *Escherichia fergusonii* em irerês (*Dendrocygna viduata*) de vida livre em rota de migração na cidade de São Paulo.

Os irerês (*Dendrocygna viduata*) pertencem à família Anatidae e estão distribuídos em toda a região tropical da América do Sul até a Bolívia, Argentina e Uruguai e também na África (Sick, 1997; Candido, 2014). São aves migratórias sazonais, que podem ser vistas em maior número em épocas de cheia, nas regiões de campos inundados, rios, lagos, baías, pântanos e vazantes (Nunes; Tomas, 2008). Aves migratórias têm importância reconhecida na epidemiologia da transmissão de doenças virais como Influenza aviária e Doença de Newcastle (Candido, 2014), mas pouco se sabe sobre a possibilidade de disseminação de enterobactérias.

Este trabalho evidenciou, pela primeira vez, a presença de *E. fergusonii* em anatídeos de vida livre. O cultivo bacteriano das amostras cloacais e de orofaringe dos irerês (*Dendrocygna viduata*) resultou em um total de 97 estirpes isoladas, das quais 5 (5,15%) foram identificadas como *E. fergusonii*, sendo 2/5 isolados de orofaringe e 3/5 isolados de cloaca.

Não existem relatos anteriores sobre *Escherichia fergusonii* em irerês e a microbiota desses animais não é muito estudada, o que torna difícil a confirmação do potencial patogênico para a espécie. No entanto, dados de literatura atentam para os riscos potenciais de disseminação de enterobactérias virulentas e resistentes para o meio ambiente, veiculadas por aves de vida livre (Saviolli et al., 2016).

Saviolli e colaboradores (2016) investigaram aves de vida livre da espécie *Fregata magnificens* (Fragata-comum) na costa brasileira e destacaram a participação destas como reservatório de estirpes de *E. coli* com fenótipo de resistência antimicrobiana. No entanto, no presente estudo as estirpes de *E. fergusonii* isoladas dos irerês foram consideradas sensíveis aos antibióticos testados (ácido nalidixico, amicacina, gentamicina, ampicilina, cefotaxima, ceftioxina, amoxicilina com ácido

clavulânico, cloranfenicol, ceftiofur, eritromicina, sulfonamida, clotrimoxazol, tetraciclina e enrofloxacin) (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil de sensibilidade de estirpes de irerês de vida livre

Estirpe	Animal	Antimicrobianos testados													
		GEN	AMP	SUT	CTX	ENO	SUL	CLO	AMC	NAL	CRO	TET	TIO	AMI	CFO
16.1A	Irerê	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
35.1B	Irerê	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
33.2B	Irerê	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
45.2B	Irerê	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
47.2B	Irerê	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Tabela 5. R – S – Sensível; GEN – Gentamicina; AMP – Ampicilina; SUT – Sulfametoxazol-Trimetoprim; CTX – Cefotaxima; ENO – Enrofloxacin; SUL – Sulfonamida; CLO – Cloranfenicol; AMC – Amoxicilina com ácido clavulânico; NAL – Ácido Nalidíxico; CFO – Cefoxitina; TET – Tetraciclina; TIO – Ceftiofur; AMI – Amicacina; CFO – Ceftriaxona. (Fonte: FRANCO, L.S. Dissertação, 2018)

Embora a resistência aos antimicrobianos não tenha sido identificada em estirpes de *E. fergusonii*, outros patógenos resistentes foram identificados nos mesmos animais, incluindo *Salmonella* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., e *Citrobacter freundii* (dados não apresentados).

Todas as estirpes isoladas foram testadas para produção de hemolisina em ágar sangue. Em nenhuma das placas foi possível visualizar formação de hemólise ao redor das colônias, sendo os isolados considerados negativos no ensaio fenotípico. Os demais fatores de virulência foram investigados pela Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR e os resultados podem ser observados na tabela 6. As estirpes isoladas de irerês foram negativas para os marcadores de virulência de DEC, mas foram identificadas como positivas para os genes *iroN*, *astA*, *cvi/cva* e *ompT*, considerados marcadores de APEC (Tabela 6).

Estima-se que 40% de estirpes de *E. coli* de origem humana sejam produtoras de colicina (Smajs et al., 2002). No entanto, o plasmídeo de Colicina V (codificada pelos genes *cvi/cva*) é encontrado com maior prevalência nas estirpes virulentas de APEC. A presença deste marcador e a combinação com outros determinantes de virulência que incluem mecanismos de captura de ferro (*iroN*), produção de toxinas (*astA*) e resistência sérica (*ompT*) sugere risco sanitário potencial para aves, além da

possibilidade de transferência horizontal para outras estirpes via conjugação (Cunha, 2014).

Tabela 6. Genes de virulência pesquisados em estirpes de irerês pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Gene de virulência	16.1A	35.1B	11.2B	33.2B	45.2B	47.2B
<i>iroN</i>	+	+	+	+	+	+
<i>cvi/cva</i>	+	+	+	+	+	+
<i>astA</i>	+	+	+	+	+	+
<i>ompT</i>	+	+	+	+	+	+

Tabela 6. Todas as estirpes foram negativas para os genes *vat*, *irp*, *tsh*, *usp*, *eae*, *ipaH*, *aggR*, *hly*, *LT*, *STa*, *STb*, *stx1*, *stx2*, *ibeA*, *iutA* e *cnf*. (Fonte: FRANCO, L.S. Dissertação, 2018)

O risco zoonótico também deve ser considerado, levando-se em conta que os anatídeos são animais encontrados em parques e áreas verdes das grandes cidades, em determinadas épocas do ano, devido à oferta de alimentos (Satterfield et al., 2018). Embora existam poucos dados sobre a produção de colicina em *E. fergusonii*, foram realizados dois estudos que comprovam a existência de estirpes colicinogênicas. No primeiro, Smajs e colaboradores (2002) revelaram a similaridade entre estirpes de *E. coli* e *E. fergusonii* produtoras de colicinas, caracterizadas por uma maior persistência no trato gastrointestinal. Já no segundo estudo, foi avaliada a presença de estirpes produtoras de bacteriocinas e lisozimas dentro do gênero *Escherichia*, sugerindo uma maior incidência de estirpes de *E. fergusonii* positivas para a produção de lisozimas (Smarda et al., 2002).

A figura 1 apresenta um dendograma, com a identificação das estirpes, sítio de isolamento (origem da amostra), aves coletadas (animais) e características de virulência das amostras. Os resultados da caracterização filogenética por AFLP demonstram o agrupamento destas estirpes em 2 clados distintos. No primeiro, foram agrupadas 5 estirpes com similaridade variando de 95 a 100%, sugerindo uma relação

clonal. O segundo clado agrupou somente um isolado, com similaridade < que 90% (Figura 1).

Estes dados sugerem a relação clonal entre os isolados e provavelmente estão associados com a ecologia da espécie, que vive em bandos e utiliza águas rasas para a alimentação coletiva. Segundo Sick (1997), a procura por alimentos e áreas alagadas está entre as principais razões para se tornarem aves nômades. Sick (1997) relata a observação da espécie em diversos locais do Brasil, incluindo Maranhão e os estados do Nordeste, com maior concentração no litoral do Ceará, onde encontram condições favoráveis para nidificação. Os animais avaliados no presente estudo representam um único bando de aves que anualmente visita um clube localizado na zona sul de São Paulo e convive com diversas outras espécies locais, incluindo patos e cisnes.

No momento da coleta, o grupo de irerês estava clinicamente saudável, sem sinais clínicos aparente de doenças, sugerindo a participação destas aves como portadoras assintomáticas. Este trabalho evidenciou a participação dos irerês como reservatório de *E. fergusonii* portadoras de plasmídeos de virulência característicos de APEC. Novos estudos são necessários para melhor entendimento da epidemiologia das infecções por *E. fergusonii* em aves migratórias, bem como os riscos de saúde pública e de transmissão destas estirpes para outras aves.

Figura 1. Perfis genotípicos de *Escherichia fergusonii* isoladas de irerês determinados pelo AFLP.

(Fonte: FRANCO, L.S. Dissertação, 2018)

5.2 Caracterização de virulência e resistência de *Escherichia fergusonii* em aves silvestres cativas

A classe das aves compreende o maior grupo de vertebrados terrestres, com aproximadamente 8.700 espécies (Pough et al., 2003). No Brasil são reportadas 1.590 espécies, agrupadas em 86 famílias e 23 ordens; este valor corresponde a 55,3% das aves residentes na América do Sul (Sick, 1997). Apesar da grande biodiversidade brasileira, muitas espécies encontram-se ameaçadas em função da caça predatória, tráfico de animais selvagens e diminuição dos *habitats*. Neste contexto, a manutenção de aves em cativeiros (incluindo zoológicos, criatórios, parques e aquários) representa uma forma importante de preservação da biodiversidade (IUCN, 1992).

A manutenção de aves em cativeiro pode contribuir para a conservação *in situ* das espécies ameaçadas de extinção. No entanto, a dificuldade de manejo de aves silvestres em cativeiro pode alterar a microbiota entérica, aumentando de forma expressiva a colonização intestinal por *Escherichia coli* e impactando de forma negativa a saúde das aves e os processos de reabilitação e soltura (Mattes et al., 2005; Sanches et al., 2017).

Saidenberg e colaboradores (2017) avaliaram a colonização intestinal por *E. coli* em psitacídeos de vida livre, reportando índices de positividade menores que 2%. Em cativeiro, no entanto, a presença de *E. coli* na microbiota de psitacídeos pode variar de 20 a 80%, dependendo das condições de biossegurança do criatório (Mattes et al., 2005). Não existem dados na literatura sobre a prevalência bacteriana do gênero *Escherichia* em aves cativas, embora a presença de psitacídeos portadores de *Escherichia fergusonii* tenha sido reportada recentemente (Vaz et al., 2017).

Neste trabalho foram avaliadas 168 amostras isoladas de aves silvestres cativas das ordens passeriformes, psitacíformes, strigiformes, falconiformes e accipitriformes. Estas ordens foram selecionadas por incluírem a maioria das espécies apreendidas do tráfico ilegal de animais selvagens. Das 168 colônias isoladas, foram identificadas apenas duas estirpes de *Escherichia fergusonii*, como ilustra a Tabela 7. Uma estirpe foi isolada da orofaringe de um canário da terra (*Sicallia flaveola flaveola*) e outra foi isolada da cloaca de um Gavião-Pombo pequeno (*Buteogallus*

lacernulatus). As demais colônias não fermentadoras de lactose isoladas das aves de apreensão foram negativas para identificação de *E. fergusonii*, pela técnica de MALDI-TOF MS. Não foi observada a presença do agente na ordem psitacíforme, diferindo dos resultados observados por Vaz e colaboradores (2017).

Tabela 7. Sítios de isolamento de *Escherichia fergusonii*.

Ordem (número de animais)	+ <i>E. fergusonii</i> Orofaringe	+ <i>E. fergusonii</i> Cloaca
Passeriformes (n=50)	-	1
Accipitriformes (n=8)	1	-
Psitacíformes (n=90)	-	-
Falconiformes (n=9)	-	-
Strigiformes (n=10)	-	-

(Fonte: FRANCO, L.S. Dissertação, 2018)

As duas estirpes foram negativas nos ensaios fenotípicos de produção de hemolisina. Do mesmo modo, não foram identificados genes de virulência nas estirpes, com exceção do gene *usp*, presente no isolado de canário. Este gene é um marcador de virulência presente em isolados de origem humana, associado aos quadros de infecções do trato urinário. Cunha e colaboradores (2017b) descreveram a presença do gene *usp* em estirpes de APEC do sorogrupo O6, ST73, isoladas de frangos com colibacilose aviária, com potencial zoonótico. No entanto, a maioria dos isolados de galinhas continha uma combinação de mais de oito genes de virulência, capazes de codificar a expressão de cápsula, adesinas, hemolisinas, sideróforos, evasina e toxinas (Cunha et al., 2017). Embora não se possa descartar o risco sanitário do isolado, a presença de um único gene de virulência não é suficiente para classificar esta estirpe como uma ExPEC.

Os resultados de virulência e resistência estão representados na Figura 2, onde também estão os dados de estirpes isoladas de aves de vida livre e de aves domésticas.

Figura 2. Perfis genotípicos de *Escherichia fergusonii* determinados pelo AFLP

(Fonte: FRANCO, L.S. Dissertação, 2018)

O padrão de bandas encontrado na análise filogenética demonstrou uma heterogeneidade dos isolados de aves cativas, com baixa similaridade (16,6%) em relação as estirpes identificadas em aves de vida livre e em galinhas comerciais. Diferentemente do que foi reportado nas aves de vida livre, as amostras isoladas de aves cativas não são clonais e provavelmente têm uma origem distinta.

O perfil de resistência antimicrobiana revelou que a estirpe isolada de canários era sensível aos antimicrobianos testados. No entanto, o isolado de gavião apresentou resistência a mais de uma classe de medicamentos, sendo resistente à ampicilina e à ceftriaxona.

O isolado de gavião-pombo pequeno (O3.1.3) foi positivo para o gene *bla*_{CTX-M-8}. Essa variante do grupo CTX-M, grupo de ESBL mais disseminado mundialmente, foi descoberta em estirpes de *Enterobacter* spp. e *Citrobacter amalonaticus* isoladas no Rio de Janeiro no final da década de 1990 (Bonnet et al., 2000). A variante CTX-M-8 é endêmica no Brasil, e ao lado de CTX-M-2, são as ESBL mais prevalente no país (Rocha; Pinto; Barbosa, 2015). Minarini e colaboradores (2009) descreveram isolados clínicos de *E. coli* provenientes de humanos produtores de CTX-M-8 no estado de Minas Gerais. Também foram descritos isolados de *E. coli* de frangos de corte do estado de São Paulo que albergavam o gene *bla*_{CTX-M-8} (Ferreira et al., 2014). Porém, não existem relatos de *E. fergusonii* produtoras de CTX-M-8, portanto esse é o primeiro relato dessa variante ESBL nesta espécie.

Por se tratar de um predador de topo de cadeia alimentar, uma das hipóteses é de que esta bactéria possa estar presente em presas menores, aumentando as chances de ingestão por meio da caça. A dieta destes animais é muito variada e inclui invertebrados (como insetos, besouros e aranhas), cobras, lagartixas, roedores e algumas aves de pequeno porte (Garske; Andrade, 2004; Mikich; Bérnils, 2004). São animais que normalmente caçam suas presas no solo e podem ser vistos junto a bandos mistos de aves, quatis ou macacos (Sick, 1997; Carvalho et al., 2009).

O Gavião-Pombo pequeno é uma espécie rapinante endêmica no Brasil, exclusiva da Mata Atlântica, ocorrendo em baixas densidades da Bahia a Santa Catarina (Sick, 1997; Mikich & Bérnils, 2004; ICMBio, 2014). Segundo o ICMBio (2004), essa espécie possui uma população que não ultrapassa 10.000 indivíduos adultos. A espécie sofre ameaças devido a descaracterização e redução do seu

habitat (Mikich; Bérnils, 2004). Embora os dados de infecções por enterobactérias em gaviões sejam escassos, um estudo semelhante realizado por Bangert (1988) em um grupo de 32 falcões cativos isolou três estirpes de *Escherichia fergusonii*, sugerindo uma predisposição destes rapinantes em albergar o agente. No entanto, as estirpes identificadas pelo autor não foram caracterizadas para a presença dos determinantes de virulência e resistência.

5.3. Caracterização de virulência e resistência de *Escherichia fergusonii* em galinhas em sistema de criação comercial convencional e sistema orgânico no estado de São Paulo, Minas Gerais e Paraná

O sistema de criação de aves apresentou crescimento progressivo nas últimas décadas, saltando de 217 mil toneladas em 1970 para 12,9 milhões de toneladas em 2016, definindo o Brasil como o segundo maior produtor de carne de frango (CEPEA, 2014). Na produção de ovos, o Brasil ocupa a oitava posição no Ranking mundial, mas o aumento do consumo *per capita* de ovos subiu de menos de 90 ovos no início dos anos 2000, para mais de 160 ovos nos dias atuais (ABPA, 2016). A transição da criação tradicional para a agroindústria foi alcançada pela introdução de novas tecnologias, melhoramento genético e nutrição balanceada (Tavares; Ribeiro, 2007). O uso de aditivos anticoccidianos, promotores de crescimento, quimioterápicos e ingredientes de origem animal na ração é permitido na avicultura convencional, porém segue as normas sanitárias vigentes (Hullanco, 2004).

Na avicultura orgânica, o bem-estar dos animais é o principal objetivo e os animais são criados em sistemas extensivos, com acesso ao ar livre. Nesse tipo de produção, não há restrições de linhagens, e sua exploração comercial segue a legislação brasileira para sistemas orgânicos de produção (Demattê Filho; Pereira, 2017). Suas particularidades em relação aos outros sistemas de criação são referentes a não utilização de agrotóxicos, adubos químicos ou sintéticos e medicamentos antimicrobianos (Azevedo, 2016; Demattê Filho; Pereira, 2017).

A comparação da presença de *Escherichia fergusonii* nos diferentes sistemas de criação nunca foi avaliada, embora existam relatos pontuais com identificação de percentuais de até 76% da presença de *Escherichia coli* nas fezes de frangos de corte em criações comerciais e alternativas (Rocha, 2013). No presente trabalho, foram avaliadas 215 amostras fecais que resultaram no isolamento de 22 estirpes de *E. fergusonii*. Das 22 estirpes 2/60 foram identificadas na criação de frangos de corte convencional, 5/55 nas criações de poedeiras criadas em sistema convencional de baterias e 15/100 isoladas de poedeiras criadas em sistemas orgânicos.

O perfil de resistência antimicrobiana foi avaliado pelo método de difusão em disco e os resultados estão apresentados na tabela 8. Três das cinco estirpes isoladas de galinhas de postura comercial apresentaram o mesmo perfil de multirresistência, com resistência para tetraciclina, sulfonamida, ácido nalidíxico e sultametazol + trimetoprima. Os isolados de frangos de corte também apresentam multirresistência aos antimicrobianos, sendo uma estirpe resistente a gentamicina, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, cefotaxima, enrofloxacina, sulfonamida, cloranfenicol, ácido nalidíxico, tetraciclina e ceftiofur e outra resistente a gentamicina, ampicilina, cefotaxima, enrofloxacina, sulfonamida, ácido nalidíxico, tetraciclina e ceftiofur.

Dois isolados de frangos de corte do Paraná, apresentaram resistência a cefalosporinas (FA54 e FA48). Esses isolados foram positivos para os genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-55} (Tabela 8). Além de *bla*_{CTX-M-55}, o isolado FA48L apresentou a beta-lactamase TEM-1B. Curiosamente essas duas estirpes foram positivas para genes de resistência às quinolonas e mutações em *gyrA* e *parC* (Tabela 6). A estirpe FA48 apresentou os genes *qnrB19* e o isolado FA54 o gene *qnrD*.

Tabela 8. Valores da CIM, beta-lactamases, genes de resistência às quinolonas (PMQR) e mutações em *gyrA* e *parC* em dois isolados multirresistentes de *E. fergusonii*

Estirpe	CIM (mg/L)							β-lactamases	PMQR	Mutações
	CTX	TIO	CAZ	CPM	MAR	ENR	NAL			
FA48	>64	>64	64	>64	32	>64	>256	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-1b}	<i>qnrB19</i>	<i>gyrA</i> - S83L <i>parC</i> - S80I
FA54	>64	>64	8	64	32	64	>256	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>qnrD</i>	<i>gyrA</i> - S83L

(Fonte: FRANCO, L.S. Dissertação, 2018)

Recentemente, Cunha e colaboradores (2017) fizeram o primeiro relato de *bla*_{CTX-M-55} no Brasil. Esses autores descreveram isolados ExPEC de aves de produção no Paraná que albergavam os genes *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{TEM-1b} e *qnrB19*, no

mesmo estado de origem dessas amostras. Isso demonstra que plasmídeos portando esses genes estão se disseminando interespecíes, não apenas em *E. coli*. Além disso, este é o primeiro relato de produção de CTX-M-55 em *E. fergusonii*. Em relação à CTX-M-2, há relato de duas estirpes de frangos no Brasil descritos, assim como no presente trabalho, uma das estirpes isoladas de frango de corte foi encontrada a produção de CTX-M-2, sugerindo a transferência de genes de resistência através de plasmídeos (Ferreira et al., 2016).

No sistema orgânico não foram detectadas estirpes multirresistentes. Ao contrário, 6/15 estirpes foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Outras 6/15 estirpes apresentaram resistência a apenas um antibiótico (ampicilina, ácido nalidíxico, tetraciclina ou gentamicina) e 3/15 apresentaram resistência a dois antibióticos, com as combinações gentamicina e sulfametoxazol+trimetoprim, sulfonamida e tetraciclina, ampicilina e tetraciclina. O antibiótico com maior índice de resistência foi a tetraciclina, com 5/15 estirpes resistentes.

Estes dados sugerem que as estirpes isoladas de aves criadas em sistemas que utilizam antibióticos com a função terapêutica e de melhoradores de desempenho sofrem maior pressão seletiva na comparação com aquelas criadas em sistemas livres de antimicrobianos, a exemplo do que já foi relatado para outros agentes como *Escherichia coli* e *Campylobacter* spp. (Cunha et al., 2017; Stella et al., 2017; Ribeiro, 2017).

Simmons e colaboradores (2016) relatam a presença de isolados de *E. fergusonii* em galinhas resistentes a ampicilina (75,1%), estreptomicina (62,9%) e tetraciclina (57,1%). Já Ferreira e colaboradores (2016) relatam a presença de 2 estirpes de *E. fergusonii* isolados de frangos de corte criados em granjas convencionais do estado de São Paulo multirresistentes e carreadoras de CTX-M-2.

Todos os isolados de *Escherichia fergusonii* foram testados para produção de hemolisina em ágar sangue. Não foi possível visualizar formação de hemólise ao redor das colônias, sendo todas as estirpes consideradas negativas no ensaio fenotípico.

Tabela 9. Perfil de sensibilidade de estirpes de galinhas

Estirpes	Animal	Antimicrobianos testados													
		GEN	AMP	SUT	CTX	ENO	SUL	CLO	AMC	NAL	CRO	TET	TIO	AMI	CFO
44-L5	Galinha Comercial	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	-	S	S
10-L2	Galinha Comercial	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	-	S	S
50-L5	Galinha Comercial	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	-	S	S
57-L3	Galinha Comercial	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6-L2	Galinha Comercial	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FA48	Frango de corte	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S
FA54	Frango de corte	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S
L2.3	Galinha Orgânica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L2.7	Galinha Orgânica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L2.8	Galinha Orgânica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L2.10	Galinha Orgânica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L3.7	Galinha Orgânica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L4.6	Galinha Orgânica	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S
L5.3	Galinha Orgânica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
L6.4	Galinha Orgânica	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L7.9	Galinha Orgânica	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
L7.10	Galinha Orgânica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
L8.7	Galinha Orgânica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L9.8	Galinha Orgânica	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L10.2	Galinha Orgânica	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L10.6	Galinha Orgânica	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
L10.9	Galinha Orgânica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S

Tabela 9. R – resistente; S – Sensível; GEN – Gentamicina; AMP – Ampicilina; SUT – Sulfametoxazol-Trimetoprim; CTX – Cefotaxima; ENO – Enrofloxacin; SUL – Sulfonamida; CLO – Cloranfenicol; AMC – Amoxicilina com ácido clavulânico; NAL – Ácido Nalidíxico; CFO – Cefoxitina; TET – Tetraciclina; TIO – Ceftiofur; AMI – Amicacina; CFO – Ceftriaxona. (Fonte: FRANCO, L.S. Dissertação, 2018)

Na investigação dos fatores de virulência através da Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR, 12/22 estirpes foram consideradas positivas para pelo menos um dos genes testados, como observado na tabela 9. Nove estirpes apresentaram positividade para apenas um gene, duas foram positivas para dois genes e uma foi positiva para três genes.

Tabela 10. Genes de virulência pesquisados em estirpes de galinhas pela Reação em Cadeia pela Polimerase - PCR

Estirpes	Animal	<i>eae</i>	<i>astA</i>	<i>ompT</i>	<i>tsh</i>	<i>usp</i>	<i>iroN</i>	<i>irp</i>	<i>iutA</i>
44-L5	Galinha Comercial	-	-	-	-	-	-	+	-
10-L2	Galinha Comercial	-	-	-	-	-	-	-	-
50-L5	Galinha Comercial	-	-	-	+	-	-	-	-
57-L3	Galinha Comercial	-	-	-	-	+	-	-	-
6-L2	Galinha Comercial	-	-	-	-	-	-	-	-
FA48	Frango de corte	-	-	-	-	-	-	-	+
FA54	Frango de corte	-	-	-	-	-	-	-	+
L2.3	Galinha Orgânica	-	-	-	-	-	-	-	-
L2.7	Galinha Orgânica	-	-	-	-	+	-	-	-
L2.8	Galinha Orgânica	-	-	-	-	+	-	-	-
L2.9	Galinha Orgânica	-	-	-	-	-	-	-	-
L2.10	Galinha Orgânica	-	-	-	-	-	-	-	-
L3.7	Galinha Orgânica	-	-	+	-	+	+	-	-
L3.9	Galinha Orgânica	-	-	-	-	-	-	-	-
L4.6	Galinha Orgânica	-	-	-	-	-	-	-	-
L5.3	Galinha Orgânica	-	-	-	-	-	-	-	-
L6.4	Galinha Orgânica	-	+	-	-	-	-	-	-
L7.10	Galinha Orgânica	-	+	-	-	-	-	-	-
L8.7	Galinha Orgânica	-	-	-	-	-	-	-	-
L9.8	Galinha Orgânica	-	-	+	-	-	-	-	-
L10.2	Galinha Orgânica	-	-	+	-	-	-	-	-
L10.9	Galinha Orgânica	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 8. Todas as estirpes foram consideradas negativas para os genes *cvi/cva*, *ibeA*, *vat*, *cnf1*, *hlyF*, *usp*, *ipaH*, *aggR*, *LT*, *STa*, *STb*, *sxt1* e *sxt2*.

Curiosamente, o gene *usp* foi o mais prevalente com 4/15 isolados positivos. Este gene é um marcador de estirpes de origem humana e codifica uma proteína específica de UPEC, mas já foi detectado anteriormente em isolados de *E. coli* do sorogrupo O6 em quadros de colibacilose aviária (Knöbl, 2016).

Dois isolados de aves criadas em sistemas orgânicos foram positivos para o gene que codifica a toxina EAST-1. No entanto, estes isolados foram negativos para o gene estrutural *aggR*, que classifica as estirpes como EAEC, na categoria diarreiogênica. O gene *astA* tem sido encontrado em estirpes isoladas de animais, principalmente leitões e a sua presença pode ou não estar associada a quadros de diarreia nestes animais (Souza et al., 2016).

Neste trabalho foram encontradas estirpes de *E. fergusonii* positivas para sistemas diferentes de captura de ferro incluindo aerobactina (*iut*), salmochelina (*iroN*)

e Yersiniabactina (*irp*). A produção de diversos tipos de sideróforos representa uma vantagem adaptativa da bactéria na obtenção de ferro do hospedeiro, aumentando a virulência dos isolados de *E. coli* (Sussman, 1997).

Dois outros marcadores de virulência importantes detectados neste estudo foram os genes *tsh* e *ompT*. O gene *tsh* codifica uma hemaglutinina termosensível, membro da família das SPATES (Serino proteases autotransportadoras de Enterobacterias). Esta hemaglutinina possui atividade mucinolítica e participa do processo de colonização da traqueia, contribuindo também para a lesão em sacos aéreos. Existem ainda evidências de que estirpes portadoras de *tsh* têm maiores chances de sobreviver aos efeitos bactericidas do soro. A deleção do gene *tsh* reduz a patogenicidade das estirpes de APEC (Kobayashi et al., 2010). As funções de aderência, invasão e evasão do sistema imunológico das aves também podem ser exercidas por proteínas de membrana externa, dentre as quais se destaca a *ompT* (Sussman, 1997), identificada em 3/15 estirpes investigadas.

Em conjunto estes dados apontam a presença de estirpes de *E. fergusonii* resistentes e portadoras de genes de virulência na cadeia de produção de aves e ovos. Para avaliar a filogenia destas estirpes foi realizado um dendograma com os dados obtidos pela técnica de AFLP (Figura 3).

As 22 estirpes foram agrupadas em 11 perfis distintos, com similaridade variando de 70 a 100%. Embora o grupo apresente um certo grau de heterogeneidade, alguns agrupamentos revelaram estirpes com 100% de similaridade, como é o caso do perfil A1 que agrupou 5 isolados de galinhas poedeiras do estado de São Paulo, o perfil A5 que agrupou 5 isolados, sendo 4 destes procedentes da mesma granja no estado de Minas Gerais, e o perfil A7 que agrupou 2 isolados de frangos de corte do estado do Paraná. Enquanto algumas estirpes coletadas na mesma origem foram agrupadas no mesmo perfil, outras foram separadas do grupo e apresentaram menor similaridade. Estes dados sugerem que existe relação clonal entre alguns isolados, mas em um mesmo local podem ser encontrados mais de um clone circulante. Observamos, ainda, que o AFLP se mostrou uma ferramenta útil para estudo da distribuição de *E. fergusonii* em granjas aviárias.

Figura 3. Perfis genotípicos de *Escherichia fergusonii* isolados de galinhas determinados pelo AFLP.

(Fonte: FRANCO, L.S. Dissertação, 2018)

CONCLUSÃO

A identificação e caracterização de estirpes de *Escherichia fergusonii* nas espécies de aves silvestres de vida livre e cativas representa o primeiro relato de literatura. A técnica do MALDI-TOF MS foi utilizada como uma ferramenta fundamental na identificação dessas estirpes.

Em nenhum dos isolados observou-se produção de hemolisinas.

Os irerês foram identificados como reservatórios de um clone de *E. fergusonii* sensível aos antimicrobianos, mas portadores dos determinantes de virulência de APEC: *iroN*, *astA*, *cvi/cva* e *ompT*.

Nas aves cativas, *E. fergusonii* foi identificada nas ordens passeriformes e accipitriformes. O isolado de canário, apresentou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados, já o isolado positivo para *E. fergusonii* em gavião-pombo pequeno apresentou resistência a ampicilina e ceftriaxona, sendo positivo para o gene *bla*_{CTX-M-8}.

E. fergusonii foi identificada em aves criadas em sistemas de criação convencional e orgânico. Foram identificados alguns determinantes de virulência de APEC.

As estirpes isoladas de sistemas convencionais apresentaram resistência múltipla aos antibióticos. Em frangos foram identificados os genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-55}.

Dentre os fatores de virulência pesquisados, o gene *usp* foi o mais frequente, presente em 26% dos isolados de galinhas deste estudo.

A técnica do AFLP mostrou uma relação clonal entre as estirpes de *E. fergusonii* isoladas de irerês de vida livre, mas uma elevada heterogeneidade entre as espécies cativas investigadas. Para as aves comerciais a similaridade variou de 70 a 100%, indicando possibilidade de agrupamento entre estirpes de uma mesma granja.

REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Disponível em: <<http://ubabef.com.br>> Acesso em Maio de 2018.

Adler, C.; Corbalan, N.S.; Seyedsayamdost, M.R.; Pomares, M.F.; De Cristobal, R.E.; Clardy, J.; Vincent, P.A. Catecholate siderophores protect bacteria from pyochelin toxicity. **PloS One**, v.7, n.10, p. e46754, 2012.

Azevedo, G.S.; Souza, J.P.L.; Cardoso, J.A.; Araujo, P.H.H.; Neta, E.R.S; Novas, M.P.V. **Produção de Aves em sistema orgânico**. Pubvet. v.10, n.4, p.327-333, 2016

Bain, M. S., C. C. Green. Isolation of *Escherichia fergusonii* in cases clinically suggestive of Salmonellosis. **Vet. Rec.** 144:511, 1999.

Barbieri, N.L.; de Oliveira, A.L.; Tejkowski, T.M.; Pavanelo, D.B.; Rocha, D.A.; Matter, L.B.; Callegari-Jacques, S.M.; de Brito, B.G.; Horn, F. Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. **Plos One**, v.8, n.8, e72322, 2013.

Barnes, H.J.; Nolan, L.K.; Vaillancourt, J.P. Colibacillosis. In: Saif, Y. (Ed.). **Disease of Poultry**. 12^aed. Ames, Iowa State: Blackwell Publishing, 2008. p.691-737.

Barnes, H.J.; Vaillancourt, J.; Gross, W.B. Colibacillosis. In: SAIF, Y. (Ed.). **Diseases of poultry**. 11th. ed. [S.l.] Iowa State University Press, 2003. p.631-652.

Benskin, C. McW. H.; Wilson, K.; Jones, K.; Hartley, I.R. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. **Biol. Rev.**, v.84, p.349-373, 2009.

Bonnet, R.; Sampaio, J. L. M.; Labia, R.; Champs, C. D. E.; Sirot, D.; Chanal, C.; Sirot, J. A Novel CTX-M B-Lactamase (CTX-M-8) in Cefotaxime-Resistant Enterobacteriaceae Isolated in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.44, n. 7, p. 1936–1942, 2000.

Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Werthein-Van Dillen, P.M.E.; Van der Noordaa, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503, 1990.

Bours, P.H.A.; Polak, R.; Hoepelman, A.I.M.; Delgado, E.; Jarquin, A.; Matute, A.J. Increasing resistance in community-acquired urinary tract infections in Latin America, five years after the implementation of national therapeutic guidelines. **International Journal of Infectious Disease**. v.14, p.770-774, 2010.

Brenner, D.J.; Davis, B.R.; Steigerwalt, A.G.; Roddile, C.F.; McWarther, A.C.; Allen, S.D.; Farmer III, J.J.; Saitoh, Y.; Fanning, G.R. Atypical biogroups of *Escherichia coli* found in clinical specimens and description of *Escherichia hermanii* sp. nov. **Journal Clinical Microbiology**, v.15, p.703-713, 1982a

Brenner, D.J.; McWorther, A.C.; Knutson, J.K.; Steigerwalt, A.G. *Escherichia vulneris*: a new species of Enterobacteriaceae associated with human wounds. **Journal Clinical Microbiology**, v.15, p.1133-1140, 1982b.

Burgess, N.R.; McDermott, S.N.; Whiting, J. Aerobic bacteria occurring in the hind-gut of the cockroach, *Blatta orientalis*. **J.Hyg**, v.71, p.1-7, 1973.

Caldorin, M.; Almeida, I. A. Z.C.; Peresi, J. T. M.; Alves, E.C. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina *Shiga* (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **BEPA, Bol. Epidemiol. Paul. (Online)**, São Paulo, v.10, n. 110, 2013

Candido, M.V. Anseriformes (Marreco, Pato e Ganso). In: **Tratado de Animais Silvestres**. v2. c20. p330-353, 2014.

Carattoli, A. Plasmids and spread of resistance. **Int J. Med. Microbiol.** v.303, p.298-304, 2013.

Carvalho, A.F.; Miyashiro, S.; Nassar, A.F.C.; Noda, A.; Gabriel, D.T.; Baldassi, L. Caracterização molecular e fenotípica de estirpes de *Escherichia coli* produtoras de shiga-toxina (STEC) não O-157 de fezes e carcaça bovinas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.4, p.881-886, 2012.

Carvalho-Filho, E. P. M; Zorzin, G.; Canuto, M.; Carvalho, C. E. A.; Carvalho, G. D. M. **Aves de rapina diurnas do Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil.** MG BIOTA, Belo Horizonte, c.5, p. 4-43, 2009.

Cattoir, V.; Poirel, L.; Rotimi, V.; Soussy, C.-J.; Nordmann, P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 394–7, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17561500>>.

Cavaco, L. M.; Hasman, H.; XIA, S.; Aarestrup, F. M. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 603–8, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2630628&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

CDC. Vital signs: carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **MMWRMorb Mortal Wkly Rep**, 62:165–170, 2013.

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA). Informativo CEPEA, Análise Trimestral, ed.1, 2014.

Ciesielczuk, H.; Hornsey, M.; Choi, V.; Woodford, N.; Wareham, D. W. Development and evaluation of a multiplex PCR for eight plasmid-mediated quinolone-resistance determinants. **Journal of medical microbiology**, v. 62, p. 1823–1827, 2013.

Clements, A.; Young, J.; Constantinou, K.; Frankel, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v.3, p.71-87, 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third ed. Document M100-S23. Wayne, PA: CLSI.

Coelho, H.E. Colibacilose. In: **Patologia das Aves**. Tecmedd, São Paulo, 2006.

Cortes, M.A.M.; Gibon, J.; Chanteloup, N.K.; Moulin-Schouleur, M.; Gilot, P.; Germon, P. Inactivation of *ibeA* and *ibeT* results in decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908. **Infection and Immunity**, v.76, n.9, p.4129-4136, 2008.

Crawford-Miksza, L.K.; Himathongkham, S; Dodd, M.L.; Badoiu, A.S.; Badoiu, O.M.; Guthertz, L.S. Misidentification of a variant biotype of *Escherichia coli* O157:H7 as *Escherichia fergusonii* by Vitek 2 Compact. **Journal of Clinical Microbiology**. v.47, n.3. p. 872-873, 2009.

Croxen, M.A.; Finlay, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, n.1, p.26-38, 2010.

Cunha, M.P.V. **Resistência aos antimicrobianos e virulência de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) isoladas de perus com doença respiratória**. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2014.

Cunha MPV, Lincopan N, Cerdeira L, Esposito F, Dropa M, Franco LS, Moreno AM, Knöbl T. 2017. Coexistence of CTX-M-2, CTX-M-55, CMY-2, FosA3, and QnrB19 in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from poultry in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**. 61:e02474-16

Cunha, M.P.V.; Oliveira, M.G.X; Oliveira, M.C.V.; Silva, K.C; Gomes, C.R.; Moreno, A.M.; Knöbl, T. Virulence Profiles, Phylogenetic Background, and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Turkeys with Airsacculitis. **The Scientific World Journal**, 2014 <https://doi.org/10.1155/2014/289024>.

Cunha, M.P.V.; Saindenberg, A.B.; Moreno, A.M.; Piantino, A.J.F.; Vieira, M.A.M.; Gomes, T.A.T.; Knöbl, T. Pancemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. **Plos One**, v.12, 6:e0178970, 2017.

Dallenne, C.; Da Costa, A.; Decré, D.; Favier, C.; Arlet, G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–5, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20071363>>

Davies, Y. M.; Cunha, M. P. V; Oliveira, M. G. X.; Oliveira, M. C. V; Philadelpho, N.; Romeiro, D. C.; Milanelo, L.; Guimaraes, M. B.; Ferreira, A. J. P.; Moreno, A. M.; Sa, L. R. M.; Knöbl, T. Virulence and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from passerines and psittacine birds. **Avian pathology**, v. 9457, n. February, p. 1–28, 2016.

De Lorenzo, V. Martinez, J.L. Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**, v.7, p.621-629, 1988

Demattê Filho, L.C.; Pereira, G.V. Produção de frangos e ovos em sistemas diferenciados – orgânicos e caipiras. **Anais XXI Seminário Nordestino de Pecuária**. Fortaleza – CE, 2017.

DHO-Moulin, M.; Fairbrother, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v.30, p.299-316, 1999.

Ewers, C.; Li, G.; Wilking, H.; Kiebling, S.; Alt, K.; Antao, E.M.; Laturnus, C.; Diehl, I.; Glodde, S.; Homier, T.; Bohnke, U.; Steinrück, H.; Philipp, H.C.; Wieler, L.H.; Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v.297, n.3.; p.163-176, 2007.

Ewers, C.; Janßen, T.; Kiessling, S.; Philipp, H.C.; Wieler, L.H. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **Avian Disease**, v.49, n.2, p.269-273, 2005.

Ewers, C.; Janßen, T.; Kiessling, S.; Philipp, H.C.; Wieler, L.H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology**, v.104, p.91-101, 2004.

Farmer III, J.J.; Fanning, G.R.; Davis, B.R.; Ohara, C.M.; Ridle, C.; Hickman-Brenner, F.W.; Asbury, M.A.; Lowery, A.V.; Brenner, D.J. *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two news species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.21, n.1, p.77-81, 1985.

Fegan, N; Barlow R.S.; Gobius K.S. *Escherichia coli* O157 Somatic Antigen is Present in an isolate of *E. fergusonii*. **Current Microbiology**. v52., p. 482-486, 2006.

Ferreira, A.P.J; Knöbl, T. Colibacilose. In: Berchieri, JR et al. **Doença das aves**. Campinas, 2ª. ed. Facta. p457-574, 2009.

Ferreira, J.C.; Penha Filho, R.A.C.; Andrade, L.N.; Berchieri Jr, A.; Darini, A.L.C. Evaluation and characterization of plasmids carrying CTX-M genes in a non-clonal population of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from poultry in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.85, p.444-448, 2016.

Focaccia, R.V. **Tratado de Infectologia**. Rio de Janeiro. Atheneu, p.984-989, 2005.

Forgetta, V.; Rempel, H.; Malouin, F.; Vaillancourt Jr, R.; Topp, E.; Dewar, K; Diarra, M. S. Pathogenic and multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* from broiler chicken. **Poultry Science**. v.91, p.512-525, 2012.

Funke, G.; Hay, A.; Altwegg, M. Isolation of *Escherichia fergusonii* from four different sites in a patient with pancreatic carcinoma and cholangiosepsis. **Journal Clinical Microbiology**, v.31, p. 2201-2203, 1993.

Gaastra, W.; Kusters, J.G.; van Duijkeren, E.; Lipman, L.J.A. *Escherichia fergusonii*. **Veterinary Microbiology**. v.172, p.7-12, 2014.

Garske, C. E. S.; Andrade, V. A. Observações e capturas de *Leucopternis lacernulata* (Accipitridae) na Ilha da Marambaia, litoral sul do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Ararajuba, notas, 2004.

Germon, P.; Chen, Y.H.; He, L.; Blanco, J.E.; Brée, A.; Schouler, C.; Huang, S.H.; Moulin-Schouler, M. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.151, p.1179-86, 2012.

Gioia-Di Chiacchio, R.M.; Cunha, M.P.V.; Sturn, R.M.; Moreno, L.Z.; Moreno, A.M.; Pereira, C.B.P.; Piazza, R.M.F.; Knöbl, T. *Shiga* Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Zoonotic Risks Associated with Psittacine Pet Birds in Home Environments. **Veterinary Microbiology**, v.184, p.27-30, 2016.

Glover, B.; Wentzel, J.; Jenkins, A.; Van Vuuren, M. The first report of *Escherichia fergusonii* isolated from non-human primates, in Africa. **One Health**, v.3, p.70-75, 2017.

Godoy, S. N.; Matushima, E. R. A Survey of Diseases in Passeriform Birds Obtained From Illegal Wildlife Trade in Sao Paulo City , Brazil. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 24, n. 3, p. 199–209, 2010.

Gyles, C.L.; Fairbrother, J.M. *Escherichia coli*. In: **Bacterial Infections in Animals**. Wiley- Blackwell, p.231-265, 2010

Hullanco. M.B. A. **Aplicação de um sistema de classificação de carcaças e cortes e efeito após abate da qualidade de cortes de frangos criados em sistema alternativo**. Escola Superior Agrícola Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, 2004.

Hunter, P.R.; Gaston, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical**, 1988.

Huys, G.; Cnockaert, M.; Janda, J.M.; Swings, J. *Escherichia albertii* sp. nov. a diarrhoeagenic species isolated from stool specimen of Bangladesh children. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.53, p.807-810, 2003.

ICMBio - Aves - *Amadonastur lacernulatusi* (Temminck 1827) - gavião-pombo-pequeno, 2014. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies/5529-especie-5529.html>> Acesso em Maio 2018

IUCN. The world Zoo conservation strategy. **Zoological Society.U.S.A**, Chicago, 1992.

Johnson, J.R.; Johnson, S.J.; Nolan, L.K.; Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmid. **Journal of Bacteriology**, v.188, n;16, p.5975-5983, 2006.

Johnson, T.; Wannemuehler, Y.; Doetkott, C.; Johnson, S.J.; Rosenberger, S.; Nolan, L.K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic toll. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.12, p.3987-3996, 2008;

Johnson, T.J.; Logue, C.M.; Logue, C.M.; Jonhson, J.R.; Kuskowski, M.A.; Sherwood, J.S.; Barnes, H.J.; Debroy, C.; Wannemuehler, Y.; Obata-Yasuoka, M.; Spanjaard, L.; Nolan, Lisa K.; Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.9, n.1, p.37-46, 2012.

Klemm, P. Fimbriae: adhesion, genetics and vaccines. Boca Raton, FL: CRL Press, 1994, 283p.

Knöbl, T. **Caracterização de um clone virulento de ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*) isolado de granjas de aves comerciais no Brasil.** [Characterization of virulent clone of ExPEC (extraintestinal pathogenic *E. coli*) isolated from Brazilian poultry farms] 2016. 88f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Kobayashi, R.K.T.; Gaziri, L.C.; Vidotto, M.C. Functional activities of the Tsh protein from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains. **Journal of Veterinary Science**, v.11, n.4, p.315-319, 2010.

Kuhnert, P.; Bisgaard, M.; Korczak, B. M.; Scwendener, S.; Christensen, H.; Frey, J. Identification of animal Pasteurellaceae by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, n. January, p. 1–7, 2015

Lagacé-Wiens, P.R.S.; Baudry, P.J.; Pang, P.; Hammond, G. First description of an extended-spectrum- β -lactamase-producing multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* strain in a patient with cystitis. **Journal Clinical Microbiology**. v.28, p.2301-2302, 2010.

Liebana, E.; Carattoli, A.; Coque, T.M.; Hasman, H.; Magiorakos, A.P.; Mevius, D.; Peixe, L.; Poirel, L.; Schuepbach-Regula, G.; Torren-Edo, K.T.J.; Torres, C.; Threlfall, J. Public health Risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or *AmpC* beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risks factors, and control options. **Clinical Infectious Disease**. v.56, p.1030-1037, 2013.

Magiorakos, A.; Srinivasan, A.; Carey, R. B.; Carmeli, Y.; Falagas, M. E.; Giske, c. g.; Harbarth, S.; Hindler, J. F. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria : an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2011.

Mahapatra, A. Mahapatra, S. Mahapatra, A. *Escherichia fergusonii*: an emerging pathogen in South Orissa. Indian J. **Med. Microbiol**, v.23, p.204-208, 2005.

Mammeri, H.; Loo, M. Van De; Poirel, L.; Nordmann, P.; Martinez-Martinez, L. Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* in Europe. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 71–76, 2005.

Martins, F.H.; Guth, B.E.C.; Piazza, R.M. Leão, S.C.; Ludovico, A.; Ludovico, M.S. Dahbi, G.; Marzoa, J.; Mora, A.; Blanco, J.; Pelayo, J.S. Diversity of *Shiga* toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Parana State, southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.175, p.150-156, 2015.

Mattes, B.R.; Consiglio, S.A.S.; Almeida, B.Z.; Guido, M.C.; Orsi, R.B.; Silva, R.M.; Costa, A.; Ferreira, A.J.P.; Knöbl, T. Influência da Biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psitacídeos. **Arq. Inst. Biol**, v.72, n.1, p.13-16, 2005.

Maurer, J.J.; Brown, T.P.; Steffens, W.L.; Thayer, S.G. The occurrence of ambient temperature regulated adhesins, curli and the temperature sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.42, p.106-118, 1998.

MClauchlin, J.G.; Ripabelli, M.M.; Brett, E.J.; Threlfall. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for apidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, p.21-28, 2000.

Melton-Celsa, A.R. 2014. *Shiga* toxin (Stx) classification, structure, and function. **Microbiol Spectrum**, v.2, n.3: EHEC-0024-2013.

Mikich, S.B.; Bérnils, R.S. 2004. **Livro vermelho da fauna ameaçada no estado do Paraná**. Instituto Ambiental do Paraná, Curitiba, Brasil.

Minarini, L. a R.; Poirel, L.; Trevisani, N. a C.; Darini, A. L. C.; Nordmann, P. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum ??-lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, n. 2, p. 202–206, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.05.021>>.

Monroy, M.A.; Knöbl, T.; Bottino, J.A.; Ferreira, C.S.A.; Ferreira, A.J.P. Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v.28, n.1, p.1-15, 2005.

Mora, A.; Blanco, M.; Yamamoto, D.; Dahbi, G.; Blanco, J.; López, C.; Alonso, M.P.; Vieira, M.A.M.; Hernandez, R.T.; Abe, C.; Piazza, R.M.F.; Lacher, D.W.; Elias, W.P.; Gomes, T.A.T.; Blanco, J. HeLa- cell adherence patterns and action aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Shiga*-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different *eae* and *tir* alleles. **International Microbiology**, v.12, p.243-251, 2009.

Mora, A.; Herrera, A., Mamani, R.; López, C.; Alonso, M.P.; Blanco, M.; Blanco, J.E.; Dabhi, G.; García-Garrote, F.; Pita, J.M.; Coira, A.; Bernárdez, M.I.; Blanco, J. Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4:B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.21, p.6991-6997, 2010.

Moulin-Schouler, M.; Schouler, C.; Tailliez, P.; Kao, M.R.; Brée, A.; Germon, P.; Oswald, E.; Mainil, J.; Blanco, M.; Blanco, J. Common virulence factors and genetic relationships between O8:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.10, p.3366-3376, 2007.

Nataro, J.P.; Kaper, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology**, v. 11, p.142-201, 1998.

Nunes, A.P; Tomas, W.M. Aves Migratórias e nômades ocorrentes no Pantanal. **Embrapa Pantanal**. p36-39, 2008.

Oh, J.Y.; Kang, M.S.; An, B.K.; Shin, E.G.; Kim, M.J.; Kwon, J.H.; Kwon, Y.K. Isolation and epidemiological characterization of heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia fergusonii* from healthy chickens. **Veterinary Microbiology**. v.160, p.170-175, 2012.

Pal, A.; Ghosh, S.; Ramamurthy, T.; Yamasaki, S.; Tsukamoto, T.; Bhattacharya, S.K.; Nairb, G.B.; Takeda, Y. Shiga toxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta, India. *Indian J. Med. Res.*, v.110, p.83-85, 1999.

Pough, H.; Janis, C. M.; Heiser, J. B. **A vida dos vertebrados**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, p.744, 2003.

Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C., Família Enterobacteriaceae Inn: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Cap 18, p115, 2005.

Rayamajhi, N.; Cha, S.B.; Shin, S.W.; Jung, B.Y.; Lim, S.; Yoo, H.S. Plasmid typing and resistance profiling of *Escherichia fergusonii* and other Enterobacteriaceae isolates from south Korean farm animals. **Applied and Environmental Microbiology**. v.77, n.9, p.3163-3166, 2011.

Ribeiro, M.L. **Qualidade das carcaças de frango de abatedouros e pontos de venda de Goiás: pesquisa de *Campylobacter* termotolerantes**. 2017. 67f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

Rimoldi, G.M.; Moeller Jr, R.B. *Escherichia fergusonii* associated with pneumonia in a beef cow. **Journal of Veterinary Medicine**, 2013.

Rocha, F. R.; Pinto, V. P. T.; Barbosa, F. C. B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. mdr.2015.0180, 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2015.0180>>.

Rocha, T.M. **Genes de virulência em *Escherichia coli* isolada de frangos de corte de criações industriais e alternativas**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Goiás, 2013.

Sanches, T. C. **Causas de morte em Passeriformes: comparação entre aves de vida livre residentes na Região Metropolitana de São Paulo e aves oriundas do tráfico**. 2007.

Saidenberg, A.B.S.; Guedes, N.M.R.; Seixas, G.H.F.; Allgayer, M.C.; Assis, E.P.; Silveira, L.F.; Melville, P.A.; Benites, N.R. A survey for *Escherichia coli* virulence factors in asymptomatic free-ranging parrots. **Vet. Science**. v.12, p.1-6, 2012.

Saidenberg, A. B. S.; Knöbl, T.; Melville, P. A.; Zuniga, E.; Salaberry, S. R. S.; Benites, N. R.; Brandão, P. E. An Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolate with Possible Human and Domestic Animal Origin from a Free-Living Lear's Macaw (*Anodorhynchus leari*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 53, n. 2, p. 396–398, 2017.

Satterfield, D.A.; Marra, P.P.; Sillent, T.S.; Altizer, S. Responses of migratory species and their pathogens to supplemental feeding. **The Royal Society**. 2018.

Savini, V.; Catavittello, C.; Talia, M.; Manna, A.; Pompetti, F.; Favaro, M.; Fontana, C.; Febbo, F.; Balbinot, A.; Berardino, F, Bonaventura, G.; Zacom, S.; Esattore, FF.; Antonio, D. Multidrug-Resistant *Escherichia fergusonii*: a case of acute cystitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.4, p.1551-1552, 2008

Saviolii, J.Y.; Cunha, M.P.V.; Guerra, M.F.L.; Irino, K.; Catão-Dias, J.L; Carvalho, V.A. Free-Ranging Frigates (*Fregata magnificens*) of the Southeast Coast of Brazil Harbor Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* resistant to antimicrobials. **Plos One** 11(2): e0148624. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148624>

Schubert, S.; Rakin, A.; Karch, H.; Carniel, E.; Heesemann, J. Prevalence of the “High-Pathogenic Island” of *Yersinia* Species among *Escherichia coli* Strains that are pathogenic to humans. **Infection and Immunity**, v.66, n.2, p.480-485, 1998.

Schouler, C.; Schaeffer, B.; Brée, A.; Mora, A.; Dahbi, G.; Biet, F.; Oswald, E.; Mainil, J.; Blanco, J.; Moulin-Schouleur, M. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.5, p.1673-1678, 2012.

Sick, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira, p.862. 1997.

Sircili, M.P.; Trabulsi, L.R.; Fatores de virulência: adesão, invasão, sideróforos, evasinas. In: Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. (Ed). **Microbiologia** 4ªed. São Paulo: Atheneu, 2005, p.143-156.

Simmons, K.; Islam, M.R.; Rempel, H.; Block, G.; Topp, E.; Diarra, M. Antimicrobial Resistance of *Escherichia fergusonii* isolated from broiler chicken. **Journal of Food Protection**. v.79, n.6, p.929-938, 2016.

Simmons, K.; Rempel, H.; Block, G.; Forgetta, V.; Vaillancourt Jr, R.; Malouin, F.; Topp, E.; Delaquis, P., Diarra, M. Duplex PCR Methods for the Molecular Detection of *Escherichia fergusonii* isolates from broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**. v.80, n.6; p. 1941-1948, 2014.

Smith, J.L.; Fratamico, P.M.; Gunther, N.W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.4, n.2, p.134-163, 2007.

Sojka, W.J. Enteric diseases in new-born piglets, calves and lambs due to *Escherichia coli* infection. **Veterinary Bulletin**, v.41, p.509-522, 1971.

Souza, C.O.; Melo, T.R.B.; Melo, C.S.B.; Menezes, E.M.; Carvalho, A.C.; Monteiro, L.C.R. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreiogênica versátil. **Rev. Pan-Amaz Saúde**, v.7, n.2, 2016.

Smajs, D.; Smarda, J.; Weinstock, G.M. The *Escherichia fergusonii* iucABCD genes are located within a larger chromosomal region similar to pathogenicity islands. **Folia Microbiology**. v.48, p.139-147, 2003.

Smajs, D.; Karpathy, S. E.; Smarda, J.; Weinstock, G.M. Colicins produced by the *Escherichia fergusonii* strains closely resemble colicins encoded by *Escherichia coli*. **Microbiology Letters**. v.208, p.259-262, 2002.

Smarda, J.; Smajs, D.; Lhotová, H. Three recently acknowledged *Escherichia* species strikingly differ in the incidence of bacteriocinogenic and lysogenic strains. **Journal Basic Microbiology**. v.42, n.6, 429-433, 2002.

Stella, A.E.; Oliveira, A.F.; Moreira, C.N.; Bartoli, R.B.M.; Silva, V.L.D. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* populations collected from farm animals. **Vet e Zootec**, v.24, p.746-753, 2017.

Sussman, M. *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. Cambridge University Press, 1997. p.640.

Tavares, L.P.; Ribeiro, K.C.S. Desenvolvimento da Avicultura de corte brasileira e perspectivas frente a influenza aviária. **Organizações Rurais & Agroindústrias**, v.9, n.1, p.79-88, 2007.

Tivendale, K.A.; Allen, J.L.; Gins, C.A.; Crabb, B.S.; Browning, G.F. Association of *iss* and *iucA*, not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.72, p.6554-6560, 2004.

Toma, C; Lu, Y; Higa, N.; Nakasone, N.; Chinen, I.; Baschkier, A.; Rivas, M.; Iwanaga, M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.6, p. 2269-2671, 2003.

Trabulsi, L.R.; Altherthum, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008.

Trabulsi, L.R.; Keller, R. Gomes, T.A.T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, p.508-513, 2002.

Tsiodras, S.; Kelesidis, T.; Kelesidis, I.; Bauchinger, U.; Falagas, M. E. Human infections associated with wild birds. **J. Infect. Dis.**, v.56, p. 83-98, 2008.

Van Belkum, A.; Tassios, P.T.; Dijkshoorn, L.; Haeggman, S.; Cookson, B.; Fry, N.K.; Fussing, V.; Green, J.; Feil, E.; Gerner-Smidt, P.; Brisse, S.; Struelens, M.; Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology Infection**, v.13, p.1-46, 2007.

Vaz, F.F.; Serafini, P.P.; Locatelli-Dittrich, R.; Meurer, R.; Durigon, E.L.; Araújo, J.; Thomaselli, C.M.; Ornetto, T.; Sipinski, E.A.B.; Sezerban, R.M.; Abbud, M.C.; Raso, T.F. Survey of pathogen in threatened wild red-tailed Amazon parrot (*Amazona brasiliensis*) nestlings in Rasa Island, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v.48, n.4, 2017.

Venkatesan, M.M.; Buysse, J.M.; Kopecko, D.J. Use of *Shigella flexneri ipaC* and *ipaH* gene sequences for the general identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Journal Clin. Microbiol**, v. 12, p. 2687-2691, 1989

Vidotto, M.C.; Queiroz, M.B.; De Lima, N.C.S.; Gaziri, L.C.J. Prevalence of *ibeA* gene in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Microbiology**, v.119, n.1, p.88-89, 2007.

Vieira, M.A.M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v 33, n.4, p.406-411, 2009.

Wang, S.; Niu, C.; Shi, Z.; Xia, Y.; Yaqoob, M.; Dai, J.; Lu, C. Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.79, n.1, p.279-287, 2011.

Wang, S.; Shi, Z.; Xia, Y.; Li, H.; Kou, Y.; Yaqoob, M.; Bau, Y.; Dai, J.; Lu, C. *ibeB* is involved in the invasion and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v.159, n.3-4, p.411-419, 2012.

Wareham, D. W.; Umoren, I.; Khanna, P. Allele-specific polymerase chain reaction (PCR) for rapid detection of the *aac(6')-Ib-cr* quinolone resistance gene. **International journal of antimicrobial agents**, v. 36, n. 5, p. 467–8, nov. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724118>

Wragg, P.; La Ragione, R.M., Best, A.; Reichel, R.; Anjum, M.F.; Mafura, M.; Woodward, M.J.; Characterisation of *Escherichia fergusonii* isolates from farm animals using an *Escherichia coli* virulence gene array and tissue culture adherence assays. **Veterinary Science**. v.86, p.27-35, 2009.

Wray, C.; Woodward, M.J. *Escherichia coli* infections on farm animals. In: Sussman, M. (Ed.). **Escherichia coli: Mechanisms of Virulence**. Cambridge: Cambridge University, 1997, p.49-84.

Yamamoto, T.; Echeverria, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infection and Immunity**. v.64, n.4, p.1441-1445, 1996.

Yamamoto, S.; Terai, A.; Yuri, K.; Kurazono, H.; Takeda, Y.; Yoshida, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.12, p.85-90, 1995.

Yamane, K.; Wachino, J.; Suzuki, S.; Arakawa, Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1564–6, abr. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2292543&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

- Yavzori, M.; Porath, N.; Ochana, O.; Dagan, R.; Orni-Wasserlauf, R.; Cohen, D. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool specimens by polymerase chain reaction. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.31, p. 503-509, 1998.
- Yu, J.; Kaper, J.B. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Mol. Microbiol.**, v.6, p.411-417, 1992.
- Zhang, W.; Zhao, M.; Ruesch, L., Omot, A.; Francis, D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, v.123, p.145-152, 2007.