

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE DE
ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL (BETA
LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO) ISOLADAS DE
FRANGO DE CORTE, CARNE DE FRANGO E FEZES
HUMANAS**

Natália Pereira
Médica Veterinária

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE DE
ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL (BETA
LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO) ISOLADAS DE
FRANGO DE CORTE, CARNE DE FRANGO E FEZES
HUMANAS**

Discente: Natália Pereira

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila

Coorientadora: Dra. Marita Vedovelli Cardozo

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Agropecuária**

2020

P436v

Pereira, Natália

Virulência e patogenicidade de enterobactérias produtoras de ESBL (Beta lactamase de espectro estendido) isoladas de frango de corte, carne de frango e fezes humanas / Natália Pereira. -- Jaboticabal, 2020

44 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Fernando Antônio Ávila

Coorientadora: Marita Vedovelli Cardozo

1. Escherichia coli. 2. Klebsiella pneumoniae. 3. doença transmitida por
alimento. 4. frango de corte. 5. genes de virulência. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE DE ENTEROBACTÉRIAS
PRODUTORAS DE ESBL (BETA LACTAMASE DE ESPETRO ESTENDIDO)
ISOLADAS DE FRANGO DE CORTE, CARNE DE FRANGO E FEZES
HUMANAS

AUTORA: NATÁLIA PEREIRA

ORIENTADOR: FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA

COORDINADORA: MARITA VEDOVELLI CARDOZO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO DE ÁVILA
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. LILIAN CRISTINA MAKINO
UNESP / Registro/SP

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI
Centro de Aquicultura - CAUNESP / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 18 de fevereiro de 2020

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NATÁLIA PEREIRA – nascida em 16 de dezembro de 1991, natural de Ribeirão Preto – São Paulo, Brasil. Iniciou o curso de medicina veterinária no ano de 2012, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP), concluindo em dezembro de 2016. Em março de 2018 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP), concluindo em fevereiro de 2020. Em março de 2020, inicia o curso de doutorado no mesmo programa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar em todos os meus caminhos e estar comigo nas dificuldades.

Aos meus pais e irmã, por todo apoio, incentivo e dedicação em me ajudar durante todos esses anos. E aos meus avós pelas orações e ajuda que me deram.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila, pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório, pela dedicação, ensinamentos, incentivo e confiança.

À minha coorientadora e amiga Dra. Marita Vedovelli Cardozo, pela oportunidade de realizar um bom projeto, por todo ensinamento, dedicação e paciência, e por todas as risadas e conselhos.

Às minhas companheiras e amigas de laboratório, Mariana, Mylena, Mareliza e Camila, por compartilharem seus conhecimentos, por toda ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos professores, alunos e funcionários do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária por compartilharem conhecimento e proporcionarem um ambiente de trabalho muito bom e agradável.

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

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	4
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> shigatoxigênia (STEC).....	5
2.1.3 <i>Escherichia coli</i> patogênica para aves (APEC)	6
2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
2.2.1 Fatores de virulência de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
2.3 Características de resistência ESBL	10
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Geral.....	12
3.2 Específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1 Procedência e obtenção das amostras	13
4.2 PCR para detecção de genes de virulência	13
4.3 Identificação sorológicas dos sorotipos de <i>E. coli</i>	15
4.4 Teste de patogenicidade <i>in vivo</i>	15
4.5 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÃO	25
7. REFERÊNCIAS	25



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Detecção e caracterização de genes de virulência em enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido isoladas da avicultura"**, protocolo nº 015560/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Antonio de Ávila, 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) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 08 de novembro de 2018.

Vigência do Projeto	20/12/2018 a 20/07/2019
Espécie / Linhagem	Frangos Cobb 500
Nº de animais	390
Peso / Idade	40 g / 01 dia
Sexo	Machos
Origem	Granja

Jaboticabal, 08 de novembro de 2018.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL (BETA LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO) ISOLADAS DE FRANGO DE CORTE, CARNE DE FRANGO E FEZES HUMANAS

RESUMO - Enterobactérias produtoras de Beta lactamases de espectro estendido podem apresentar diferentes genes de virulência e alta patogenicidade, podendo estar presentes na cloaca de frangos de corte e em sua carne, o que resulta em risco de doenças para animais e humanos. Os objetivos do trabalho foram identificar genes de virulência em 36 isolados de enterobactérias, sendo 28 *Escherichia coli* e oito *Klebsiella pneumoniae* produtores de β -lactamases de espectro estendido, sorotipar as cepas de *E. coli*, realizar teste de patogenicidade *in vivo* de todos os isolados e determinar a resistência fenotípica das cepas a diferentes classes de antimicrobianos. Todos os isolados foram submetidos à técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para pesquisa dos genes de virulência, as cepas de *E. coli* foram submetidas à técnica de soro-aglutinação em lâmina para a sorotipagem, o antibiograma foi realizado pelo método de disco-difusão e o teste de patogenicidade foi realizado com inoculação em pintinhos de um dia de vida. Os isolados apresentaram alta frequência para diferentes genes relacionados à virulência de *E. coli*, como *iutA* (94,4%), *iss* e *hlyF* (88,9%), *ompT* (86,1%) e *iroN* (30,6%). Além disso, o gene *mrkD* relacionado à virulência de *K. pneumoniae* estava presente em 58,3% dos isolados. Todos os isolados foram resistentes a pelo menos três classes diferentes de antimicrobianos e 27,8% das amostras demonstraram alta patogenicidade no teste *in vivo*. Os resultados demonstraram um potencial risco de infecções para animais e humanos por *E. coli* e *K. pneumoniae* virulentas e resistentes aos antimicrobianos, gerando um alerta para autoridades de sanidade animal e saúde pública.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, doença transmitida por alimento, frango de corte, genes de virulência

VIRULENCE AND PATHOGENICITY OF ESBL PRODUCING ENTEROBACTERIA FROM BROILERS, BROILER MEAT AND HUMAN FECES

ABSTRACT - ESBL producer Enterobacteria may posse's different virulence genes and thus a high degree of pathogenicity with their presence in broilers and their by-products could be considered as a potential food born disease hazard. The aims of the study were to identify virulence genes in 36 enterobacterial isolates, 28 *Escherichia coli* and eight *Klebsiella pneumoniae* producers of extended spectrum Beta-lactamases, serotype *E. coli* strains, perform in vivo pathogenicity testing of all isolates and determine the phenotypic resistance of strains to different classes of antimicrobials. Isolates were subjected to PCR (Polymerase Chain Reaction) technique for virulence gene search, *E. coli* strains were submitted to agglutination technique for serotyping, the antibiogram was performed by disc diffusion and the pathogenicity test were performed with inoculation in day-old chicks. Isolates presented a high frequency of *E. coli* associated virulence genes, such as: *iutA* (94.4%), *iss* and *hlyF* (88.9%), *ompT* (86.1%) and *iroN* (30.6%). The *mrkD* gene was present in 58.3% of isolates. All isolates were resistant to at least three different antimicrobial classes and 27.8% of the samples showed high pathogenicity in day-old chicken test. The results demonstrated a potential risk of virulent and antimicrobial resistant *E. coli* and *K. pneumoniae* infections for animals and humans, raising an alert for animal and public health authorities.

Keywords: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, foodborne disease, broiler, virulence genes

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de carne de frango do mundo, exportando cerca de quatro mil toneladas por ano para diferentes países nos últimos anos (ABPA, 2018). Esse fato é de grande importância, pois a produção avícola apresenta significativa contribuição à economia do país. Além disso, quando contaminada, a carne pode ser uma fonte de doenças para quem a consome, gerando uma preocupação com sua sanidade.

As enterobactérias são bastonetes Gram negativos da família Enterobacteriaceae e caracterizam-se por um grupo amplo de microrganismos que habitam naturalmente o trato intestinal de animais e humanos, mas que também estão relacionadas a surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos. A *Escherichia coli* é a espécie mais comum nos intestinos, e quando encontrada na água e alimentos indica contaminação fecal, podendo ser patogênica e causar doenças diarréicas. Assim como a *E. coli*, a *Klebsiella pneumoniae* é responsável por causar danos à saúde humana, como um tipo grave de pneumonia, infecções do trato urinário e septicemia (Tortora et al., 2012).

A resistência dessas bactérias aos antimicrobianos β -lactâmicos tem sido bastante estudada ao longo dos anos, e teve início antes mesmo do lançamento da penicilina. Esses microrganismos possuem genes responsáveis por codificar fatores de resistência, como a produção de enzimas chamadas de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (Bradford, 2001). Enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido têm sido relacionadas às infecções hospitalares no mundo (Dropa et al., 2009).

Além da resistência aos β -lactâmicos, a presença de genes de virulência e patogenicidade agravam a preocupação com contaminações de alimentos causadas por esses microrganismos. Alguns patótipos de *E. coli* como a enteropatogênica (EPEC) e a shigatoxigênica (STEC) promovem diarreia sanguinolenta em seres humanos, estando relacionadas com os genes de virulência *eae* e *stx* (Younis et al., 2017).

Além destes, o patótipo de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) promove uma importante doença nas aves de produção, a colibacilose. É um patótipo oportunista que pode causar perdas econômicas para a produção devido ao descarte de carcaças, além do possível risco zoonótico para humanos através da contaminação de produtos cárneos (LeStrange et al., 2017).

A *Klebsiella pneumoniae* tem se tornado, ao longo dos anos, um grave problema de saúde pública devido à sua resistência a multi-drogas e a presença de genes de virulência, associados à infecções nosocomiais em todo o mundo (Holt e Wertheim, 2015). É associada às infecções do trato urinário, pneumonia em adultos e neonatos, septicemia e infecções em unidades de terapia intensiva (Podschun e Ullmann, 1998). Cepas resistentes a antimicrobianos β -lactâmicos podem ser isoladas de amostras retais de frangos de corte em abatedouros, evidenciando um potencial risco zoonótico dessa bactéria devido à transmissão a humanos através de produtos de origem animal, gerando um problema sanitário na cadeia produtiva agropecuária (Hiroi e Yamazaki, 2012).

A presença de genes que codificam diferentes fatores de virulência pode fazer com que as bactérias tornem-se patogênicas e causem doenças nos hospedeiros. Além de causar doenças, a possibilidade de apresentarem resistência a diferentes classes de antimicrobianos torna o tratamento dessas patogenias ineficaz. Diante de tais riscos, a transmissão de bactérias virulentas e resistentes a antimicrobianos entre animais, humanos e meio ambiente, gera uma importante preocupação com a saúde única no mundo (McEwen e Collignon, 2018).

Baseado nos riscos zoonóticos e possíveis perdas econômicas causadas pelas enterobactérias, o presente trabalho teve como objetivos identificar genes de virulência em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido e classificar as cepas de acordo com o sorotipo, resistência fenotípica aos antimicrobianos e patogenicidade. Dessa forma foram realizadas análises moleculares de isolados provenientes de avicultura do estado de São Paulo, além da sorotipagem das estirpes isoladas, a determinação de resistência a diferentes classes de antimicrobianos e teste de patogenicidade *in vivo* dos isolados positivos para genes de virulência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Escherichia coli*

Pertencente à família Enterobacteriaceae, é uma das bactérias mais bem estudadas nos laboratórios de todo o mundo. Apresenta rápida multiplicação, cerca de vinte minutos em estufa bacteriológica, metabolismo aeróbio ou anaeróbio facultativo, além de ser bastante utilizada para replicação de enzimas e outros produtos de interesse comercial (Jang et al., 2017).

A *Escherichia coli* é um microrganismo comensal da microbiota intestinal de humanos e animais, no entanto, algumas cepas podem ser patogênicas e causarem doenças. A sorotipagem dessa espécie é um método para detecção de cepas potencialmente patogênicas, relacionadas a surtos de doenças. Trata-se da caracterização dos antígenos O (somático), H (flagelar) e K (capsular) (Joensen et al., 2015). O antígeno O por si só define o sorogrupo da cepa, mas quando associado com o antígeno H, classificam o sorotipo da bactéria (Kaper et al., 2004). O antígeno O faz parte da estrutura de lipopolissacarídeos da membrana externa da célula bacteriana Gram negativa, contribuindo para sua virulência. Além disso, apresenta o maior número de variações, 188, enquanto o antígeno flagelar H chega a 55 variações (Joensen et al., 2015). Alguns sorotipos estão relacionados a surtos importantes de gastroenterites nem sempre diagnosticados rapidamente, como o O157:H7, associado à cepas de *E. coli* enterohemorrágica (Sharapov et al., 2016).

Baseado em fatores de virulência e características epidemiológicas, a *Escherichia coli* é classificada em diferentes patótipos, que podem ser de origem intestinal (InPEC) ou extraintestinal (ExPEC). Os patótipos intestinais são classificados em *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* Shigatoxigênica (STEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e difusamente aderente (DAEC). Já as *Escherichia coli* extraintestinais são chamadas de uropatogênica (UPEC), normalmente associada à infecções do trato urinário em humanos, *Escherichia coli* associada a meningite

neonatal (MNEC) e *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC), responsável por causar a colibacilose aviária (Kaper et al., 2004; Croxen e Finlay, 2010).

2.1.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

No mundo todo, especialmente em países em desenvolvimento, a maior causa de morte entre crianças de até cinco anos de idade é a diarreia ocasionada por processos infecciosos (Liu et al., 2012), sendo a EPEC considerada uma das maiores causas de surtos de diarreia (Hu e Torres, 2015). Dissemina-se pela via fecal-oral e possui a habilidade de sobreviver em ambientes ácidos como o estômago, causando sintomas como febre e anorexia (Platenkamp e Mellies, 2018). Pode ser classificada em EPEC típica (tEPEC) e atípica (aEPEC), constituindo-se uma diferença entre elas, a presença de plasmídeo de fator de aderência (pEAF) na tEPEC e sua ausência na aEPEC (Comery et al., 2013). Além disso, cepas atípicas podem ser isoladas de espécies animais como coelhos, ovinos, cães e macacos, mostrando que podem ser reservatórios e transmitir o patógeno para humanos (Croxen et al., 2013).

Esse patótipo é responsável por induzir uma lesão intestinal chamada de “*Attaching and Effacing*” (A/E). A bactéria adere-se às células epiteliais das microvilosidades intestinais e injeta fatores de virulência dentro da célula hospedeira por meio do Sistema de Secreção do tipo III (T3SS), tal ação acarreta mudanças na conformação de actina e consequente rearranjo do citoesqueleto, resultando na formação de um pedestal abaixo do sítio de ligação do microrganismo o que favorece sua aderência e contato com a célula hospedeira (Croxen e Finlay, 2010).

A habilidade de causar esse tipo de lesão se dá pela presença do gene *eae* contido em uma ilha de patogenicidade chamada de LEE (*Locus of enterocyte effacement*). O gene *eae* codifica uma proteína de membrana chamada de intimina que liga-se ao receptor translocado de intimina (Tir) localizado no pedestal das células intestinais, ocasionando mudanças em diferentes vias e processos, favorecendo a entrada do patógeno e ocasionando a doença no hospedeiro (Cepeda-Molero et al., 2017).

2.1.2 *Escherichia coli* shigatoxigênia (STEC)

A *Escherichia coli* Shigatoxigênica pode ser encontrada no trato intestinal de animais de diferentes espécies como bovinos, aves, suínos, ovinos e animais selvagens (Singh et al., 2015; Bai et al., 2016). Também pode estar presente em água e alimentos contaminados, além de ambientes rurais demonstrando uma oportunidade para a transferência horizontal de genes de virulência de cepas do ambiente e animais, para cepas presentes em humanos, possibilitando surtos de doença relacionada a esse patógeno (Trung et al., 2016).

Assim como a EPEC, a *Escherichia coli* produtora de Shiga toxina (STEC) apresenta fatores de aderência como adesinas aglutinantes e proteínas autotransportadoras de membrana, além disso algumas cepas podem conter a ilha de patogenicidade LEE, com a presença do gene *eae* responsável pela produção de intimina, causando a mesma lesão intestinal que cepas de EPEC. Essa característica favorece a ocorrência de doenças causadas pelo principal fator de virulência da STEC, a produção de Shiga toxina (Stx). Cepas desse patógeno podem apresentar dois tipos de toxina, a Stx1 e Stx2 que possuem diferentes subtipos (Feng et al., 2017).

As Shiga toxinas são codificadas pelos genes *stx1* e *stx2* que estão tipicamente presentes em bacteriófagos. A toxina Stx1 é muito semelhante à toxina produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae* e possui três subtipos que são distinguidos pela adição de letras árabicas à nomenclatura (Stx1a, Stx1c e Stx1d), enquanto a Stx2 apresenta sete subtipos (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g) que podem ser identificados por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Scheutz et al., 2012).

Esse tipo de toxina bacteriana é capaz de impedir a síntese de proteínas em células eucarióticas sensíveis. Pode causar quadros de diarreia sanguinolenta que evoluem para colites hemorrágicas (CH), trombocitopenia, síndrome urêmica hemorrágica (SUH) e falência renal, sendo que cepas que codificam a toxina Stx2 estão relacionadas com doenças mais graves do que as cepas que codificam Stx1 (Luna-Gierke et al., 2014; Melton-Celsa, 2014).

2.1.3 *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC)

A APEC é responsável por causar infecções localizadas ou sistêmicas importantes em aves, tanto de corte quanto de postura. Cepas patogênicas para aves podem estar presentes na microbiota intestinal e extraintestinal dos animais. A maioria das infecções ocorre no meio extraintestinal devido a capacidade da APEC de invadir diferentes órgãos, podendo causar infecções do trato respiratório, peritonites, salpingite, pericardite, perihepatite que podem ser chamadas de um modo geral de colibacilose, estando associada a perdas econômicas para indústria devido à baixa produção de ovos e carne, condenação de carcaças e custos com tratamento (Barbieri et al., 2013; Guabiraba e Schouler, 2015; Subedi et al., 2018).

A causa de doenças por APEC pode estar relacionada à presença de genes associados à virulência no cromossomo das cepas ou em plasmídios, e por meio de sua expressão podem tornar essas bactérias patogênicas, diferenciando-as de cepas fecais. Existem diversos genes que proporcionam os fatores de virulência das cepas de APEC e a presença de pelo menos quatro dos cinco genes, dentre eles *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss* e *iutA*, está associada a esse tipo de *E.coli* virulenta (Johnson et al., 2008).

Outros genes associados à virulência como *tsh*, *iucABCD*, *traT*, *sitA*, *irp2*, *papC*, *cvaC*, *vat*, *fimH* e *astA*, também podem ser encontrados em isolados de APEC, sendo que cada cepa pode possuir um conjunto diferente deles e consequentemente apresentar associações de fatores de virulência variados, no entanto cada uma delas é capaz de causar infecções no hospedeiro, isso demonstra que esse patótipo é bastante heterogêneo. Cada gene pode produzir um fator de virulência diferente, sendo os mais comuns adesinas, sistema de aquisição de ferro, hemaglutininas autotransportadoras e resistência sérica (Schouler et al., 2012).

As adesinas, produzidas por genes relacionados à virulência, são fatores iniciais da infecção por APEC, é por meio delas que a bactéria adere-se ao epitélio dos tecidos do hospedeiro e consegue se manter em contato com as células. Na *Escherichia coli* patogênica para aves pode haver adesinas fimbriais e não fimbriais. As adesinas fimbriais são estruturas que se estendem a partir da superfície da célula

bacteriana e desempenha funções como motilidade, transferência de DNA e adesão. Já as adesinas não fimbriais são menores e estão presentes na superfície celular para promover a agregação bacteriana e consequente adesão a fatores abióticos para formação de biofilmes (Vo et al., 2017).

Na APEC, as fímbrias do tipo 1 são relacionadas com adesão no trato respiratório superior das aves e podem ser codificadas pelo gene *fimH*, enquanto as adesinas fimbriais do tipo P são produzidas pelo gene *papC* presente no DNA cromossômico bacteriano e são capazes de se estabelecer em órgãos internos após a infecção inicial (Kawano et al., 2006; Nakazato et al., 2009).

A hemaglutinina de autotransporte sensível à temperatura é uma adesina afimbrial produzida pelo gene *tsh* responsável por auxiliar o início da infecção, colonizando sacos aéreos. Essa proteína autotransportadora também pode aderir-se aos eritrócitos do sangue e causar sua hemaglutinação. Além disso, pode apresentar atividade proteolítica, favorecendo uma infecção sistêmica no animal (Dziva e Stevens, 2008; Nakazato et al., 2009).

Outro fator de virulência importante para a sobrevivência das bactérias no organismo hospedeiro é o sistema de captação de ferro. Esse sistema permite a captação de ferro em ambientes com baixas concentrações, como os tecidos dos hospedeiros, e é possível através da expressão de alguns genes presentes em operons em plasmídios virulentos ou no cromossomo dos microrganismos (Sarowska et al., 2019).

Bactérias patogênicas produzem sideróforos, compostos orgânicos que captam ferro ambiental, por meio da expressão de genes como *iucABCD* e *iutA*, responsáveis pela síntese de aerobactina que quela o ferro. Além destes, APEC pode adquirir genes de outras enterobactérias, como *irp2* que codifica uma proteína ferro-repressiva, presente em bactérias do gênero *Yersinia* spp. e que já foi detectado em cepas de *E. coli* virulenta para humanos e aves e em *Klebsiella pneumoniae*. Os genes *iroN* responsável pela produção de sideróforos em *Salmonella* spp. e o *sitA* que codifica um sistema de transporte de ferro na mesma bactéria podem ser carregados por plasmídios até bactérias de outros gêneros como a APEC (Dziva e Stevens, 2008; Jeong et al., 2012).

O mecanismo de resistência sérica apresentado por bactérias virulentas permite com que elas escapem da fagocitose pelo sistema complemento do organismo hospedeiro. Esse mecanismo se dá pela presença dos genes *traT* e *iss* em ilhas de patogenicidade de plasmídios ColV presentes nos microrganismos. O gene *iss* está relacionado a proteínas de membrana das bactérias e auxilia na evasão da fagocitose, cepas mutantes sem esse gene têm menor resistência sérica do que cepas que apresentam o gene (Lynne et al., 2007).

O gene *ompT* codifica a proteína de membrana OmpT que causa hidrólise de moléculas antimicrobianas e degrada diversas proteínas, inclusive relacionadas ao sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, ele está envolvido nos processos de adesão e proliferação da bactéria no organismo hospedeiro, e demonstra uma influência importante na virulência e patogenicidade de cepas APEC, sendo detectado também em *E. coli* presente em infecções do trato urinário em humanos (Lundrigan e Webb, 1992; Hejair et al., 2017).

A APEC também pode apresentar genes responsáveis pela codificação de toxinas e proteínas que causam danos às células hospedeiras. O gene *hlyF*, que é positivamente regulado em aves, promove a produção de vesículas de membrana externa da bactéria, essas vesículas liberam toxinas para as células epiteliais do hospedeiro desencadeando um processo inflamatório e consequente apoptose de células eucarióticas (Murase et al., 2015). Já o gene *astA* produz uma enterotoxina termo-estável que pode lesar enterócitos e causar diarreia no hospedeiro (Ngeleka et al., 2003). Além disso, a Colicina V é uma substância com efeito antimicrobiano codificada pelo gene *cvaC* que é secretada pela *E. coli* e causa a morte de outras bactérias, a fim de melhorar as condições de competição por nutrientes (Havarstein et al., 1994; Gérard et al., 2005). Outro gene relacionado a produção de substâncias tóxicas é o *vat*, responsável por codificar uma proteína vacuolizante que possui efeito citotóxico para o hospedeiro (Parreira e Gyles, 2003).

2.2 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, assim como a *E. coli*, é uma enterobactéria, bastonete Gram negativo, anaeróbio facultativo, hidrolisa ureia e utiliza citrato em seu metabolismo, está presente no intestino de animais e humanos, mas também pode ser encontrada em solo, água e alimentos contaminados (Tortora et al., 2012).

As infecções nosocomiais estão relacionadas às cepas oportunistas que infectam pacientes debilitados, ao contrário de infecções causadas em comunidades que podem afetar pessoas saudáveis (Podschun e Ullmann, 1998).

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL já foram isoladas de suabes retais de humanos e em carne de frango embalada, contendo os mesmos genes de resistência, sugerindo que não deve ser descartada uma relação epidemiológica entre as cepas de diferentes origens, dessa forma, evidencia-se um potencial risco zoonótico desse microrganismo (Overdevest et al., 2014). Além da presença de características de resistência, essa bactéria possui alguns fatores de virulência que podem agravar o quadro infeccioso, como cápsula, adesinas, hipermucoviscosidade, sistema de aquisição de ferro, entre outros, que são responsáveis pelo aumento da patogenicidade de algumas cepas (Melo et al., 2014; Shankar et al., 2018).

2.2.1 Fatores de virulência de *Klebsiella pneumoniae*

A *K. pneumoniae* pode apresentar diferentes fatores de virulência. Dentre eles está a capacidade de aumentar a produção de cápsula, que se dá pela regulação dos genes *rpmA*, presente em plasmídeo, e *magA*, responsáveis por regular o fenótipo mucóide da bactéria e a produção de hipercápsula, respectivamente, e ambos estão associados à cepas hipervirulentas e invasivas (Paczosa e Meccas, 2016). Além destes, os genes *uge* e *wabG* codificam a camada de lipopolissacarídeos (LPS) da cápsula das bactérias, e promovem maior proteção contra a fagocitose pelo sistema

complemento, além de aumentar a capacidade de aderência nos tratos urinário e respiratório, facilitando a infecção, por isso estão bastante relacionados à cepas de *K. pneumoniae* virulentas (Regué et al., 2004; Paczosa e Mecsas, 2016).

O gene *mrkD* faz parte do operon *mrkABCDF* presente em plasmídeos ou no cromossomo de cepas de *K. pneumoniae*, e codifica adesinas fimbriais do tipo 3. Esse gene é o responsável por codificar as propriedades adesivas das fimbrias e também proporcionar a especificidade de ligação em diferentes materiais, de forma que os alelos desse gene promovem a ligação da bactéria em superfícies de mucosas como em brônquios e também no trato urinário. Cepas que contenham o operon *mrk* mas que não possuem o gene *mrkD* para a formação das adesinas fimbriais do tipo 3 não são capazes de aglutinar células e formar biofilme (Murphy e Clegg, 2012). Outro fator de virulência da *K. pneumoniae*, assim como a *E. coli*, é capacidade de captar ferro, através da presença e regulação do gene *kfu*. O sistema de aquisição de ferro promove uma melhor competitividade da bactéria pelo ferro, que muitas vezes é restringido pelo sistema imunológico do hospedeiro, e está relacionado à capacidade de causar infecção, sendo que o gene *kfu* está presente na maioria dos genomas de cepas de *K. pneumoniae* invasivas e promove a virulência *in vivo* desses microrganismos (Ma et al., 2005).

2.3 Características de resistência ESBL

As enzimas chamadas β -lactamases de espectro estendido (ESBL) são produzidas por diferentes espécies de bactérias e promovem resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, hidrolisando o anel da molécula o que impede sua ação nos microrganismos. Essas enzimas foram descobertas em isolados relacionados à infecções nosocomiais na década de 1980, tornando-se um problema em ambientes hospitalares inicialmente na Europa, mas se disseminando para diferentes continentes devido ao uso incorreto dos antimicrobianos (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Falagas e Karageorgopoulos, 2009).

As ESBLs podem ser de diversos tipos, como TEM, SHV e CTX-M. A enzima β -lactamase do tipo TEM é codificada pelo gene *bla*TEM e é a mais comum na família *Enterobacteriaceae*, principalmente em *E. coli* e *K. pneumoniae*, tendo cerca de 140 tipos descritos na literatura. Ela é responsável por promover a resistência de bactérias à ampicilina e penicilina (Saravanan et al., 2018). A β -lactamase SHV é mais comumente encontrada em *Klebsiella pneumoniae* promovendo resistência à ampicilina. O gene *bla*SHV que codifica a enzima é de origem cromossomal, no entanto também está presente em elementos móveis como plasmídeos (Liakopoulos et al., 2016).

As enzimas TEM e SHV são bastante relacionadas, de forma que ambas podem ser mediadas por elementos móveis, sofrerem substituições em aminoácidos comuns alterando assim seu fenótipo, fato que gera diferentes tipos de cada uma, além de estarem associadas à enzimas resistentes a inibidores (Bradford, 2001).

Na década de 1990, foram descobertas enzimas do grupo CTX-M, sendo bastante divergentes de TEM e SHV, possuindo maior capacidade de hidrolisar cefotaxima. O gene *bla*CTX-M que codifica essa enzima apresentava maior ocorrência no cromossomo de bactérias ambientais de diferentes espécies, no entanto, com o passar do tempo, foi transferido por meio de plasmídeos para bactérias como a *E. coli*. Dessa forma, a enzima tornou-se a mais comum em casos de infecções hospitalares (Marcadé et al., 2008; Woerther et al., 2013).

A presença de ESBL em infecções pode levar a falhas no tratamento, especialmente em pacientes com altos fatores de risco como doenças severas, cateterizados, entubados e em unidades de tratamento intensivo. Por isso é recomendado que seja feita a confirmação da presença dessas enzimas, além de teste de suscetibilidade a antimicrobianos, declarando a resistência dos microrganismos responsáveis pela infecção aos antibióticos β -lactâmicos. Além das enzimas β -lactamases de espectro estendido, também foram descobertas enzimas resistentes a inibidores como ácido clavulânico e sulbactam, que derivam dos tipos TEM e SHV, e aumentam o espectro de resistência dos microrganismos (Bradford, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Esse estudo teve como objetivo geral identificar se isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* provenientes da avicultura, produtores de enzimas Beta lactamases de espectro estendido, positivos para o gene de resistência *bla*CTX-M, possuem genes relacionados à virulência e caracterizá-los de acordo com o sorotipo, resistência fenotípica a antimicrobianos e patogenicidade, fatores que podem tornar essas bactérias patôgenicas e demonstrar um risco para saúde pública.

3.2 Específicos

- Pesquisar a presença dos principais genes relacionados à virulência de APEC e outros genes relacionados à virulência de *E. coli*;
- Pesquisar a presença dos genes *stx1* e *stx2*, e *eae* relacionados à virulência de STEC e EPEC respectivamente;
- Pesquisar a presença dos principais genes relacionados à virulência de *K. pneumoniae*;
- Determinar os sorotipos dos isolados de *E. coli*;
- Determinar o perfil de resistência dos isolados à diferentes classes de antimicrobianos;
- Determinar a patogenicidade fenotípica dos isolados através de teste *in vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Procedência e obtenção das amostras

Para realização deste estudo, foram utilizados 36 isolados de enterobactérias, sendo 28 *E. coli* e oito *K. pneumoniae* caracterizados pela técnica de MALDI-TOF Mass Spectrometry (Dingle e Butler-Wu, 2013), estocados na bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Veterinária da FCAV/UNESP Câmpus de Jaboticabal. Todas as cepas foram positivas para o gene de resistência *bla*CTX-M, sendo produtoras de ESBL. Essas amostras foram obtidas da cloaca de aves de corte (24 isolados), carne de frango (7 isolados) e fezes de humanos (5 isolados); de diferentes granjas comerciais, frigoríficos e laboratórios humanos de análises clínicas, do Estado de São Paulo, relacionados geograficamente.

4.2 PCR para detecção de genes de virulência

A preparação do DNA *template* assim como os procedimentos de PCR e respectivos *primers* utilizados foram realizados de acordo com Ewers et al., (2004). A PCR foi realizada com soluções contendo 2mM de cada dNTP, 3,6µL de 10X Dream Taq Green Buffer (que contém 20mM de MgCl₂), 1,25pmol de cada iniciador, 1 unidade de Dream Taq Green DNA Polymerase, 4µL de DNA molde e água para completar 20µL. Foram pesquisados genes relacionados à virulência de APEC, sendo eles *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, *ompT*, *sitA*, *tsh*, *traT*, *iucC*, *iucD*, *papC*, *fimH*, *vat*, *cvaC*, *astA* e *irp2*. Além destes, foram pesquisados genes relacionados à virulência de *K. pneumoniae*, como *rmpA*, *magA*, *Kfu*, *Uge*, *WabG* e *mrkD*. A descrição dos *primers* utilizados está na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* utilizados para amplificação de genes relacionados à virulência dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

Gene	Sequência do primer (5' € 3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>IroN</i>	F – AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG R- GATCGCCGACATTAAGACGCAG	667	Rodriguez-Siek et al., 2005
<i>irp2</i>	F – AAGGATTCGCTGTTACCGGAC R – TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	287	Rodriguez-Siek et al., 2005
<i>lutA</i>	F – GGCTGGACATCATGGGAACCTGG R – CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	Johnson & Stell et al., 2000
<i>lucC</i>	F – CGCCGTGGCTGGGGTAAG R – CAGCCGGTTCACCAAGTATCACTG	541	Skyberg et al., 2003
<i>lucD</i>	F – TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT R – AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG	602	Siqueira et al., 2009
<i>SitA</i>	F – AGGGGGCACAACCTGATTCTCG R – TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	608	Runyen-Janecky et al., 2003
<i>Iss</i>	F – CAGCAACCCGAACCACTTGATG R – AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	Rodriguez-Siek et al., 2005
<i>TraT</i>	F – GGTGTGGTGCGATGAGCACAG R – CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	290	Johnson & Stell et al., 2000
<i>Tsh</i>	F – GGGAAATGACCTGAATGCTGG R – CCGCTCATCAGTCAGTACCAC	420	Maurer et al., 1998
<i>FimH</i>	F – TGCAGAACGGATAAGCCGTGG R – GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	Siqueira et al., 2009
<i>PapC</i>	F – GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG R – ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328	Siqueira et al., 2009
<i>HlyF</i>	F – GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC R – GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	450	Rodriguez-Siek et al., 2005
<i>Vat</i>	F – TCCTGGGACATAATGGTCAG R – GTGTCAGAACGGAATTGT	981	Ewers et al., 2004
<i>CvaC</i>	F – CACACACAAACGGGAGCTGTT R – CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	680	Johnson & Stell et al., 2000
<i>OmpT</i>	F – TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT R – TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	496	Johnson & Stell et al., 2000
<i>astA</i>	F - TCGGATGCCATCAACACAGT R - GTCGCGAGTGACGGCTTTGTAG	125	Ngeleka et al., 2003
<i>rpmA</i>	F - ACTGGGCTACCTCTGCTTCA R - CTTGCATGAGCCATCTTTCA	535	Brisse et. al., 2009
<i>magA</i>	F - GGTGCTCTTTACATCATTGC R - GCAATGGCCATTTGCGTTAG	1282	Shah et al., 2017
<i>mrkD</i>	F - CCACCAACTATTCCCTCGAA R - ATGGAACCCACATCGACATT	240	Shah et al., 2017
<i>Kfu</i>	F - GAAGTGACGCTGTTTCTGGC R - TTTCGTGTGGCCAGTGACTC	797	Shah et al., 2017
<i>Uge</i>	F - TCTTCACGCCTTCCCTCACT R - GATCATCCGGTCTCCCTGTA	534	Shah et al., 2017
<i>wabG</i>	F - CGGACTGGCAGATCCATATC R - ACCATCGGCCATTTGATAGA	683	Brisse et al., 2009
<i>stx1</i>	F - AGAGCGATGTTACGGTTTG R- TTGCCCCCAGAGTGCGATG	388	China et. al., 1996
<i>stx2</i>	F - TGGGTTTTTCTTCGGTATC R- GACATTCTGGTTGACTCTCTT	807	China et. al., 1996
<i>eae</i>	F - AGGCTTCGTCACAGTTG R - CCATCGTCACCAGAGGA	570	China et. al., 1996

4.3 Identificação sorológicas dos sorotipos de *E. coli*

As amostras de *E. coli* foram identificadas através da pesquisa do antígeno somático O (sorogrupo O1-O188) e flagelar H (H1-H56). A sorologia foi realizada pela técnica de soro aglutinação em lâmina, com o uso de anti-soros específicos como descrito por Orskov e Orskov (1992). Essa técnica foi realizada no Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo/SP, Brasil, utilizando os anti-soros produzidos pelo mesmo instituto.

4.4 Teste de patogenicidade *in vivo*

Esse procedimento foi executado na Agência Paulista de Tecnologia em Agronegócios (APTA- Bastos/SP) com todas as estirpes que apresentaram genes relacionados à virulência, e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA), protocolo nº 015560/18. O teste foi realizado através da inoculação de 0,1 mL de cultura bacteriana, no saco aéreo torácico esquerdo de pintinhos de um dia de idade, como descrito por Monroy et al. (2005). Para cada estirpe e também para os controles positivo e negativo, foram utilizados grupos de 10 pintainhos machos de linhagem comercial, variedade branca. Para a preparação do inóculo foi semeada uma colônia de cada estirpe bacteriana em 10 mL de caldo BHI, incubada por 18 horas a 37°C e em seguida a cultura foi diluída em uma proporção de 1:10. A concentração do inóculo foi padronizada em 10^7 UFC/mL (unidades formadoras de colônias/mL). Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *E. coli* (sorogrupo O1, genes de virulência *cva-cvi+*, *tsh+*, *iucD+*, *iss+*) pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Ornitopatologia da USP. As aves usadas como controle negativo foram inoculadas com uma cultura conhecidamente apatogênica de *E. coli* e com caldo BHI (Brain Heart Infusion). As aves foram mantidas em observação durante 10 dias, e de acordo com o índice de mortalidade, as estirpes foram classificadas em alta ($\geq 80\%$), intermediária

(>50% e <80%), baixa patogenicidade ($\leq 50\%$) e não-patogênica (mortalidade zero) (Monroy et. al., 2005).

4.5 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os isolados foram submetidos a testes de sensibilidade frente aos seguintes antimicrobianos: ampicilina (10 μ g), estreptomicina (10 μ g), gentamicina (10 μ g), tetraciclina (30 μ g), nitrofurantoína (300 μ g), sulfametoxazol+trimetoprim (25 μ g), amicacina (30 μ g), cefoxitina (30 μ g), cefalotina (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), amoxicilina + ácido clavulânico (30 μ g), norfloxacin (10 μ g) e fosfomicina (50 μ g). Para a realização desses testes as cepas isoladas foram repicadas em tubos contendo 3mL de caldo BHI e incubadas a 35 °C até atingirem o padrão 0,5 de MacFarland. Após a incubação as culturas diluídas foram semeadas, com o auxílio de suabes estéreis, em placas contendo ágar Mueller-Hinton e, após aproximadamente três minutos, tempo necessário para a secagem da superfície do meio, foram colocados os discos contendo os antimicrobianos. A leitura foi realizada após 18h de incubação a 35 °C através da medida dos halos de inibição, com a utilização de régua milimetrada. Os diâmetros obtidos em milímetros foram comparados com um guia CLSI (2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à metodologia utilizada para análise de todas as amostras estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição de espécie e origem de cada isolado, e resultados referentes à pesquisa de genes de virulência relacionados à APEC e *K. pneumoniae*, patogenicidade, sorotipos de *E. coli* e antibiograma.

Isolado	Espécie	Origem	APEC*	Outros genes APEC	<i>K. pneumoniae</i>	Patogenicidade	Sorotipo	Antibiograma	
								Resistentes	Sensíveis
1	<i>K. pneumoniae</i>	Cloaca	-	-	<i>mrkD</i>	Baixa	-	NOR, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	EST, AMC, GEN, AMI, FOS, CFO
2	<i>K. pneumoniae</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT</i>	<i>mrkD</i>	Não patogênica	-	EST, AMC, NOR, GEN, AMP, CFO, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI, FOS
3	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, iroN, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT</i>	<i>mrkD</i>	Baixa	ONT:H32	EST, NOR, GEN, AMP, CFL, CAZ, TET, SUT	AMC, AMI, FOS, CFO, NIT
4	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, iroN, ompT, iutA</i>	<i>astA, fimH, iucC, sitA, traT</i>	<i>mrkD</i>	Intermediária	ONT:H32	EST, AMC, NOR, FOS, AMP, CFO, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	GEN, AMI
5	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, iroN, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT</i>	<i>mrkD</i>	Alta	ONT:H32	EST, AMC, NOR, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	GEN, AMI, FOS, CFO
6	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, fimH, iucC, sitA, traT</i>	-	Intermediária	ONT:H32	EST, AMC, NOR, AMI, AMP, NIT, CFL, CAZ TET, SUT	GEN, FOS, CFO
7	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, iroN, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT</i>	-	Baixa	ONT:H32	EST, AMC, NOR, AMI, AMP, NIT, CFL, CAZ, CFZ, TET, SUT	GEN, FOS, CFO
8	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, iroN, ompT, iutA</i>	<i>astA, fimH, iucC, iucD, sitA, traT</i>	-	Alta	ONT:H32	EST, AMC, NOR, GEN, AMP, NIT, CFL, CAZ TET, SUT	AMI, FOS, CFO
9	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, iroN, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT</i>	-	Intermediária	ONT:H32	EST, AMC, NOR, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	GEN, FOS, AMI, CFO
10	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, papC, sitA, traT</i>	-	Baixa	ONT:H32	EST, AMC, NOR, GEN, AMI, AMP, CFL, CAZ, TET, SUT	FOS, CFO, NIT
11	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, papC, sitA, traT</i>	-	Baixa	ONT:H32	EST, AMC, NOR, GEN, AMI, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	FOS, CFO
12	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT</i>	-	Não patogênica	ONT:H32	EST, AMC, NOR, GEN, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI, FOS, CFO
13	<i>K. pneumoniae</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT</i>	<i>mrkD</i>	Alta	-	EST, AMC, NOR, GEN, AMP, CFO, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI, FOS
14	<i>K. pneumoniae</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT</i>	<i>mrkD</i>	Alta	-	EST, AMC, NOR, GEN, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI, FOS, CFO
15	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, sitA, traT</i>	<i>mrkD</i>	Não patogênica	ONT:H32	EST, AMC, NOR, GEN, FOS, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI, CFO
16	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT, tsh</i>	<i>mrkD</i>	Intermediária	ONT:H32	EST, AMC, NOR, GEN, AMI, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	FOS, CFO
17	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT, tsh</i>	-	Intermediária	OR:H16	EST, AMC, NOR, GEN, AMI, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	FOS, CFO
18	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, sitA, traT, tsh</i>	<i>mrkD</i>	Baixa	ONT:H32	EST, AMC, NOR, GEN, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI, FOS, CFO
19	<i>K. pneumoniae</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, cvaC, fimH, iucC, sitA, traT, tsh</i>	<i>mrkD</i>	Baixa	-	EST, AMC, NOR, GEN, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI, FOS, CFO

20	<i>K. pneumoniae</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, cvaC, sitA</i>	<i>mrkD</i>	Alta	-	EST, AMC, NOR, GEN, AMI, FOS, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	CFO
21	<i>E. coli</i>	Cloaca	-	<i>sitA, traT</i>	-	Não patogênica	O139:H19	EST, AMC, NOR, GEN, FOS, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI, CFO
22	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT</i>	-	Não patogênica	ONT:H32	EST, AMC, NOR, GEN, AMI, FOS, AMP, CFL, CAZ, TET, SUT	CFO, NIT
23	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>iutA</i>	<i>iucC, sitA, traT</i>	-	Não patogênica	O153:H34	EST, AMC, NOR, GEN, AMI, AMP, CFL, CAZ, TET, SUT	FOS, CFO, NIT
24	<i>E. coli</i>	Cloaca	<i>iutA</i>	<i>iucC, sitA, traT</i>	-	Não patogênica	O153:H34	EST, AMC, NOR, GEN, AMI, AMP, CFO, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	FOS
25	<i>E. coli</i>	Fezes humanas	<i>hlyF, iss, iroN, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT</i>	<i>mrkD</i>	Intermediária	ONT:H32	EST, AMC, NOR, GEN, AMI, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	FOS, CFO
26	<i>E. coli</i>	Fezes humanas	<i>hlyF, iss, iroN, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT</i>	<i>mrkD</i>	Intermediária	ONT:H32	EST, AMC, NOR, GEN, FOS, AMP, CFO, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI
27	<i>E. coli</i>	Fezes humanas	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>cvaC, iucC, sitA, traT, tsh</i>	<i>mrkD</i>	Não patogênica	O139:H19	EST, AMC, NOR, AMI, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	GEN, FOS, CFO
28	<i>K. pneumoniae</i>	Fezes humanas	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>cvaC, sitA, traT, vat</i>	<i>mrkD</i>	Não patogênica	-	EST, AMC, NOR, GEN, FOS, AMP, CFO, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI
29	<i>E. coli</i>	Fezes humanas	<i>hlyF, iss, iroN, ompT, iutA</i>	<i>astA, cvaC, papC, sitA, traT, vat</i>	<i>mrkD</i>	Baixa	O87:H15	EST, AMC, NOR, GEN, FOS, AMP, CFO, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI
30	<i>E. coli</i>	Carne de frango	<i>hlyF, iss, iutA</i>	<i>astA, fimH, iucC, iucD, sitA, traT</i>	<i>mrkD</i>	Intermediária	ONT:H32	EST, AMC, NOR, GEN, AMI, FOS, AMP, CFO, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	-
31	<i>E. coli</i>	Carne de frango	<i>hlyF, iss, iroN, ompT, iutA</i>	<i>astA, fimH, iucC, sitA, traT</i>	-	Alta	O139:H19	EST, AMC, NOR, GEN, AMP, CFO, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI, FOS
32	<i>E. coli</i>	Carne de frango	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, papC, sitA, traT</i>	<i>mrkD</i>	Alta	ONT:H32	EST, NOR, GEN, AMP, CFO, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMC, AMI, FOS
33	<i>E. coli</i>	Carne de frango	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, sitA, traT</i>	-	Não patogênica	ONT:H32	EST, AMC, NOR, GEN AMI, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	FOS, CFO
34	<i>K. pneumoniae</i>	Carne de frango	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, sitA, traT</i>	<i>mrkD</i>	Alta	-	EST, AMC, NOR, GEN, AMP, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI, FOS, CFO
35	<i>E. coli</i>	Carne de frango	<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT</i>	<i>mrkD</i>	Alta	ONT:H32	EST, NOR, GEN, AMP, CFO, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMC, AMI, FOS
36	<i>E. coli</i>	Carne de frango	<i>hlyF, iss, iroN, ompT, iutA</i>	<i>astA, iucC, sitA, traT</i>	-	Alta	ONT:H32	EST, AMC, NOR, GEN, AMP, CFO, NIT, CFL, CAZ, TET, SUT	AMI, FOS

*: Classificação de acordo com Johnson et. al. (2008) para cepas potencialmente APEC (*Escherichia coli* patogênica para aves), tendo resultado positivo para pelo menos quatro dos cinco genes: *hlyF*, *iroN*, *iss*, *iutA* e *ompT*.

AMC: amoxicilina + ácido clavulânico; AMI: amicacina; AMP: ampicilina; CAZ: ceftazidima; CFL: cefalotina; CFO: cefoxitina; EST: estreptomicina; FOS: fosfomicina; GEN: gentamicina; NIT: nitrofurantoína; NOR: norfloxacin; TET: tetraciclina; SUT: sulfametoxazol + trimetoprim.

Segundo Johnson et al. (2008), um critério para definir uma cepa como APEC potencialmente virulenta é a presença de pelo menos quatro de cinco genes associados à virulência, sendo eles *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT*, assim, dos 36 isolados, 86,1% (31) foram positivos para pelo menos quatro dos genes citados, incluindo cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* (Tabela 2). No presente trabalho, foi encontrado 85,7% dos isolados de *E. coli* com potencial APEC, no entanto, quando analisadas somente as cepas de *K. pneumoniae*, 7 (87,5%) de oito apresentaram quatro dos cinco genes, demonstrando que estes podem ser transmitidos para diferentes patótipos de *E. coli* e também para bactérias de outros gêneros como demonstrado por Candan e Aksöz (2015) que também encontraram genes como *iutA* e *iroN*, relacionados à virulência de APEC em cepas de *K. pneumoniae*. Esses dados demonstraram que a APEC é um patótipo de *E. coli* heterogêneo e de difícil classificação.

Em relação aos demais genes associados à virulência de *E. coli* (Figura 1), o trabalho demonstrou uma baixa frequência dos genes *fimH*, *papC* e *tsh*, correspondendo à 16,6%, 11,1% e 13,9%, respectivamente. Tais genes são relacionados a codificação de adesinas fimbriais (*fimH* e *papC*) e não fimbriais (*tsh*) que podem facilitar a infecção pelo patógeno, uma vez que elas são responsáveis pela primeira etapa de adesão ao epitélio do sistema respiratório das aves e a órgãos internos (Dziva e Stevens, 2008). A presença desses genes pode ocorrer em alta frequência em cepas potencialmente APEC, como demonstrado por (Barbieri et al., 2013; Borzi et al., 2018).

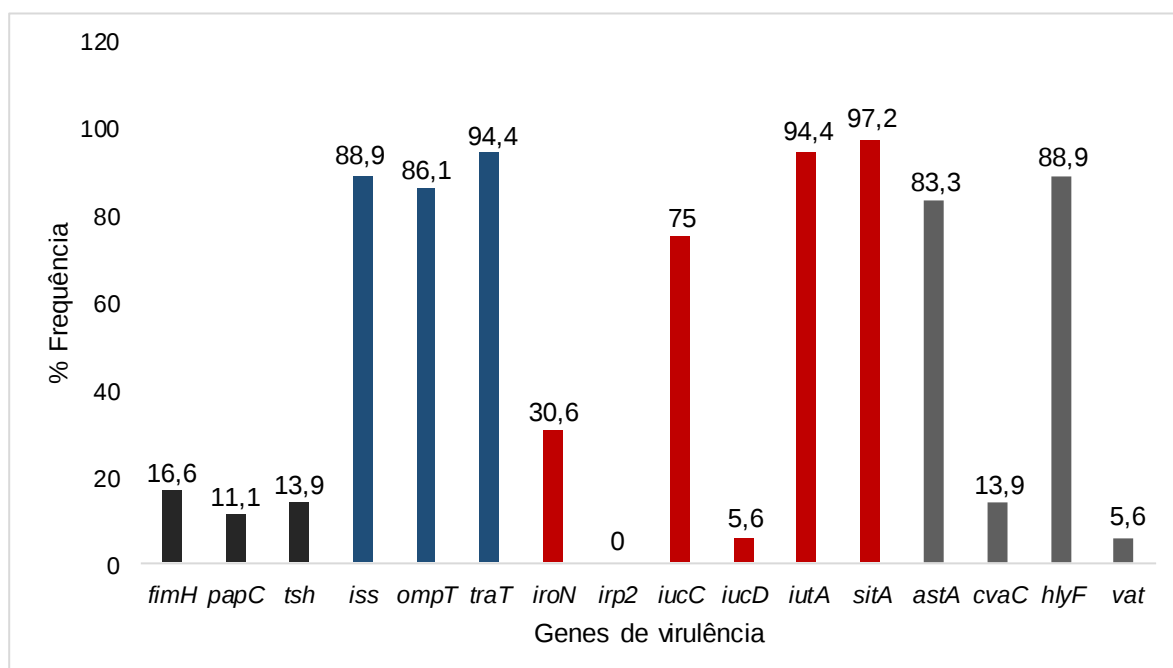


Figura 1. Frequência de cada gene associado à virulência de APEC nos 36 isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*. Produção de adesinas: *fimH*, *papC*, *tsh*. Resistência sérica: *iss*, *ompT*, *traT*. Aquisição de ferro: *iroN*, *irp2*, *iucC*, *iucD*, *iutA*, *sitA*. Produção de toxinas: *astA*, *cvaC*, *hlyF*, *vat*.

Já *ompT*, *iss* e *traT* foram encontrados com maior frequência nas amostras deste estudo, sendo *iss* em 88,9% das cepas, *ompT* em 86,1% e *traT* em 94,4%, algo bastante comum em outros trabalhos (Cummins et al., 2019). Tais genes mostram o potencial de resistir dentro do organismo hospedeiro devido à produção de proteínas de membrana externa que impedem a fagocitose promovida pelo sistema complemento (Hejair et al., 2017; Lynne et al., 2007). Esses genes apresentaram maior frequência em cepas APEC isoladas de aves com colibacilose do que em cepas não patôgenicas em diferentes regiões do Brasil, por isso podem demonstrar alta relação com a patogenicidade e ocorrência de doenças em aves (Carli et al., 2015).

Outros genes também testados como, *iucC* (75,0%), *iucD* (5,6%), *iutA* (94,4%), *iroN* (30,6%), *sitA* (97,2%) e *irp2* (0,0%) foram frequentes nas amostras. São relacionados ao sistema de aquisição e metabolismo de ferro pela bactéria, e segundo Rodriguez-Siek et al. (2005) determinados genes e operons associados a esse sistema estão amplamente distribuídos entre cepas de APEC, de forma que podem estar altamente relacionados à patogenicidade de doenças em aves como a colibacilose.

Nesse estudo, observou-se a presença de outro grupo de genes: *vat* (5,6%), *astA* (83,3%), *hlyF* (88,9%) e *cvaC* (13,9%), demonstrando aumento no risco de virulência dessas cepas, pois podem, respectivamente, codificar uma proteína vacuolizante, codificar toxina termoestável, produzir α -hemolisina e promover a produção da proteína colicina V. Esses fatores de virulência podem contribuir significativamente para o aumento da patogenicidade das cepas pois permitem que o microrganismo tenha melhores condições de competição por nutrientes no organismo hospedeiro, além de causar danos às células hospedeiras, e ocasionar doenças como a diarreia (Ngeleka et al., 2003; Gérard et al., 2005; Murase et al., 2015; Paixão et al., 2016; Zhao et al., 2019).

Em relação aos genes de virulência associados à STEC (*stx1* e *stx2*) e EPEC (*eae*), todos os isolados demonstraram resultado negativo. Os genes *stx* e *eae* estão relacionados à cepas de *Escherichia coli* Shigatoxigênica (STEC) e *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) e o fato de ambos os genes não terem sido encontrados em nenhuma cepa, pode ser justificado pois, EPEC é mais comumente encontrada em surtos de diarreia em crianças e em espécies animais como ovinos, coelhos e cães, enquanto STEC é mais isolada de espécie bovina (Croxen et al., 2013). Embora cepas de *E. coli* isoladas de aves possam apresentar positividade para os genes *stx* e *eae*, a frequência de ocorrência destes é baixa, sendo necessário um número de amostras maior para aumentar a chance de serem detectados (Bagheri et al., 2014; Alonso et al., 2016).

Os 36 isolados também foram testados para genes associados à virulência de *K. pneumoniae*, sendo que apenas o gene *mrkD* apresentou positividade (58,3%), tanto em cepas de *K. pneumoniae* quanto em cepas de *E. coli*. As adesinas fimbriais do tipo 3 são codificadas por vários genes presentes em um operon, sendo ele *mrkABCDF*. Foram primeiramente descobertas em cepas de *K. pneumoniae*, mas atualmente já são identificadas em bactérias de diferentes gêneros, incluindo a *E. coli*, e isso se deve à presença do operon não só no cromossomo mas como também em plasmídios conjugativos, podendo haver transferência lateral desses genes (Burmolle et al., 2008; Ong et al., 2010). O gene *mrkD* que codifica as propriedades adesivas das fímbrias do tipo 3 é responsável por proporcionar a formação de biofilmes em materiais abióticos. Alelos desse gene presentes em cepas de *Klebsiella* spp. são responsáveis pela especificidade das ligações fimbriais aos materiais como o

colágeno, além disso proporcionam a habilidade de aderência em células dos tratos urinário e respiratório, e em materiais como catéteres (Murphy e Clegg, 2012). A presença desse gene em 58,3% das amostras estudadas, incluindo cepas de *K. pneumoniae* e *E. coli*, demonstra um alto risco de virulência e também zoonótico, uma vez que enterobactérias são encontradas em animais e também estão relacionadas à infecções dos tratos urinário e respiratório humano de caráter nosocomial (Melo et al., 2014).

Os sorotipos encontrado entre as amostras de *E. coli* foram O139:H19 (3 isolados, 10,7%), O153:H34 (2 isolados, 7,1%) e O87:H15 (um isolado, 3,6%). A maioria dos isolados foram consideradas não tipáveis para o antígeno somático (O), mas apresentaram antígeno flagelar H32 (21 isolados, 75,0%). Apenas uma cepa foi considerada rugosa, não sendo possível a tipagem do antígeno O, no entanto esta apresentou antígeno flagelar H16. Além disso, dos três isolados pertencentes ao sorotipo O139:H19, um apresentou quatro dos cinco genes relacionados à virulência de APEC e demonstrou alta patogenicidade. Ruth Wang et al. (2018) encontraram relação entre o sorogrupo O139 com cepas de *E. coli* Shigatoxigênica (STEC) isoladas de amostras fecais de espécies bovinas, isso demonstra que a sorotipagem pode não ser adequada para determinar a virulência de uma cepa e não ser suficiente para classificar patótipos, já que os sorogrupos mais relacionados à APEC patogênica são O1, O2 e O78, enquanto no presente trabalho a maioria foi não tipável e o sorotipo O139:H19 pôde ser classificado como APEC virulenta (Ewers et al., 2005). As cepas consideradas do sorotipo O153:H34 não demonstraram patogenicidade e apresentaram apenas um dos cinco genes relacionados à APEC, demonstrando que essas podem não ser classificadas como esse patótipo. Balière et al. (2016) demonstraram relação do sorogrupo O153 com cepas de *E. coli* Enteropatogênica (EPEC) isoladas de amostras de moluscos e suas respectivas áreas de criação.

No teste de patogenicidade *in vivo* (Tabela 2), 27,8% (10) dos isolados apresentaram alta patogenicidade para pintainhos de um dia de vida, 22,2% (8) apresentaram patogenicidade intermediária, 22,2% (8) demonstraram baixa patogenicidade e 27,8% (10) foram não patogênicos no teste. Das 10 amostras classificadas como altamente patogênicas, 5 foram isoladas de carne de frango e 5 isoladas de cloaca. A presença de genes de virulência que podem ser expressos e codificar diferentes fatores de virulência, pode influenciar na presença e aumento da

patogenicidade de cepas bacterianas (Barbieri et al., 2013). Isolados altamente patogênicos presentes em cloaca e carne de frango podem representar um risco para quem manipula e consome o alimento contaminado.

Além disso, um fato importante demonstrado neste trabalho, é a presença de genes relacionados à virulência de *E. coli* e *K. pneumoniae* em cepas isoladas de fezes humanas. Todos os isolados demonstraram a presença do gene de virulência de *K. pneumoniae*, *mrkD* e de diferentes genes relacionados à virulência de APEC. Isso demonstra que pode haver uma relação entre as bactérias potencialmente virulentas presentes em animais e humanos, já que patógenos isolados de infecções humanas foram relacionados geneticamente à cepas presentes em animais como aves e suínos (Manges, 2016; Projahn et al., 2019). E dos cinco isolados de fezes humanas, dois apresentaram patogenicidade intermediária e um, baixa patogenicidade, demonstrando que de acordo com a regulação dos genes relacionados à virulência, essas bactérias podem apresentar patogenicidade fenotípica para humanos e também outras espécies animais (Sarowska et al., 2019).

No teste de antibiograma, todos os isolados foram resistentes a seis antimicrobianos (Cefalotina, Ceftazidima, Tetraciclina, Ampicilina, Norfloxacin e Sulfametoxazol com trimetoprim), incluindo diferentes classes além dos Beta Lactâmicos, fato que pode sugerir a presença de genes relacionados à resistência a outras classes de antimicrobianos. Dessa forma, todos os isolados bacterianos foram resistentes a pelo menos três classes diferentes de antimicrobianos, o que caracteriza resistência a multidrogas (Tenover, 2006; Yassin et al., 2017), como consta na Tabela 1 e na Figura 2.

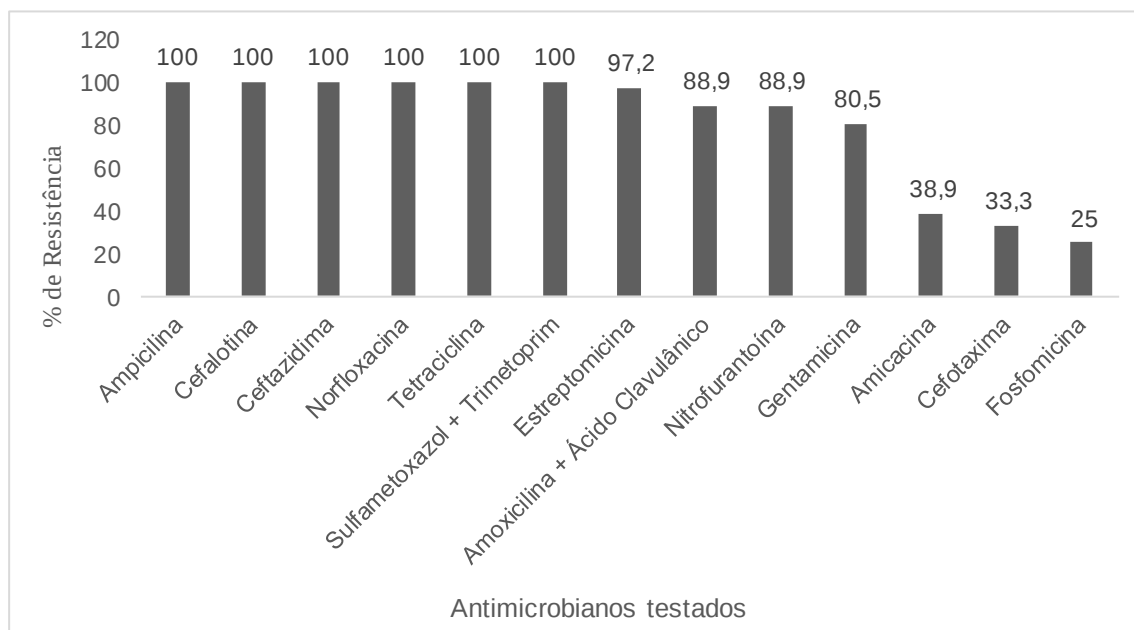


Figura 2. Porcentagem de cepas resistentes a diferentes antimicrobianos.

Cepas de enterobactérias resistentes a antimicrobianos já foram isoladas em amostras de alimentos de origem animal e em humanos (Sorensen et al., 2001; Marshall e Levy, 2011). Esses índices encontrados na literatura e no presente estudo mostram que o uso indiscriminado e incorreto de antimicrobianos na produção animal pode elevar a resistência dos microrganismos a esses compostos por meio da pressão seletiva de bactérias já resistentes em animais e seus produtos. Em consequência, essas bactérias resistentes podem disseminar diferentes mecanismos de resistência por meio da transferência de genes para outras bactérias presentes, tanto em outros animais como em humanos, gerando um problema global de saúde única relacionado à eficácia do uso desses medicamentos para tratamento de infecções causadas por esses microrganismos (McEwen e Collignon, 2018; Watkins e Bonomo, 2016).

Dessa forma, microrganismos patogênicos e resistentes a diferentes classes de antimicrobianos já são um problema de saúde pública atualmente, mas a disseminação descontrolada de genes de resistência na cadeia produtiva animal, em humanos e consequentemente no meio ambiente sugere que no futuro poderá haver um agravamento na falha de terapias para as infecções e que as alternativas de tratamento poderão tornar-se cada vez mais reduzidas (Tamhankar e Lundborg, 2019).

6. CONCLUSÃO

- Enterobactérias isoladas da avicultura podem abrigar diferentes genes relacionados à virulência;
- Esses genes quando expressos podem promover alta patogenicidade dos microrganismos, elevando o risco da ocorrência de doenças em animais;
- Isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* podem apresentar resistência a diferentes classes de antimicrobianos;
- Esses resultados demonstram um potencial risco de infecções para outros animais e humanos causadas por enterobactérias virulentas e resistentes, e servem como alerta para autoridades de sanidade animal e saúde pública sobre o manejo sanitário correto na produção animal e uso consciente de antimicrobianos.

7. REFERÊNCIAS

ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal). Relatório Anual, 2018. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>. Acesso em: 08 agosto de 2019.

Alonso MZ, Kruger A, Sanz ME, Padola NL, Lucchesi PMA (2016) Serotypes, virulence profiles and *stx* subtypes of Shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from chicken derived products. **Revista Argentina de Microbiologia** 48:325 – 328.

Bagheri M, Ghanbarpour R, Alizade H (2014) Shiga toxin and beta-lactamses genes in *Escherichia coli* phylotypes isolated from carcasses of broiler chickens slaughtered in Iran. **International Journal of Food Microbiology** 177: 16 – 20.

Bai X, Hu B et. al. (2016) Molecular and Phylogenetic Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains in China. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 6: 1 – 11.

Balière C, Rincé A, Delannoy S, Fach P, Gourmelon M (2016) Molecular Profiling of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Enteropathogenic *E. coli* Strains Isolated from French Coastal Environments. **Applied and Environmental Microbiology** 82: 3913 – 3927.

Barbieri NL, Oliveria AL, Tejkowski TM, Pavanelo DB, Rocha DA, Matter LB, Callegari-Jacques SM, Brito BG, Horn F (2013) Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. **PLoS ONE** 8: 1 – 9.

Borzi MM, Cardozo MV, Oliveira ES, Pollo AS, Guastalli EAL, Santos LF, Ávila FA (2018) Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from free-range helmeted guinea fowl. **Brazilian Journal of Microbiology** 49: 107 – 112.

Bradford PA (2001) Extended spectrum beta-lactamase in the 21 century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. **Clinical Microbiology Reviews** 14: 933 – 951.

Briesse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebise R, Diancourt L, Grimont P (2009) Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization . **Plos One**. 4: e4982.

Burmölle M, Bahl MI, Jensen LB, Sørensen SJ, Hansen LH (2008) Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in *Enterobacteriaceae* strains. **Microbiology**. 154: 187 – 195.

Candan ED, Aksoz N (2015) *Klebsiella pneumoniae* : characteristics of carbapenem resistance and virulence factors *. **Acta Biochimica Polonica** 62: 3–10.

Carli S de, Ikuta N, Lehmann FKM, Silveira VP, Predebon GM, Fonseca ASK, Lunge VR (2015) Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil. **Poultry Science** 94: 2635–2640.

Cepeda-Molero M, Berger CN, Walsham ADS, Ellis SJ, Wemyss-Holden S, Schüller S, Frankel G, Fernández LA (2017) Attaching and effacing (A/E) lesion formation by enteropathogenic *E. coli* on human intestinal mucosa is dependent on non-LEE effectors. **PLoS Pathogens** 13: 1–23.

China B, Pirson V, Mainil J (1996) Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex In Vitro Amplification of Virulence-Associated Genes. **Applied and Environmental Microbiology** 62: 3462 – 3465.

Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (2015). Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; 364 Approved Standard - Twelfth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. 365 Wayne, PA.

Comery R, Thanabalasuriar A, Garneau P, Portt A, Boerlin P, Reid-Smith R, Harel J, Manges AR, Gruenheid S (2013) Identification of potentially diarrheagenic atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains present in Canadian food animals at slaughter and in retail meats. **Applied and Environmental Microbiology** 79: 3892–3896.

Croxen MA, law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB (2013) Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews** 26: 822–880.

Croxen MA, Finlay BB (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews** 8: 26–38.

Cummins ML, Reid CJ et. al. (2019) Whole genome sequence analysis of Australian avian pathogenic *Escherichia coli* that carry the class 1 integrase gene. **Microbial Genomics** 5: 1–13.

Dingle TC, Butler-Wu S (2013) MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. **Clinics in Laboratory Medicine** 33: 589–609.

Dropa M, Balsalobre LC et. al. (2009) Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo** 51: 203–209.

Dziva F, Stevens MP (2008) Colibacillosis in poultry: Unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian Pathology** 37: 355–366.

Ewers C, Janben T, Kiebling S, Philipp HC, Wieler LH (2004) Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology** 104: 91–101.

Ewers C, Janben T, Kiebling S, Philipp HC, Wieler LH (2005) Rapid Detection of Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Avian Diseases** 49: 269–273.

Falagas ME, Karageorgopoulos DE (2009) Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. **Journal of Hospital Infection** 73: 345–354.

Feng PCH, Delannoy S, Lacher DW, Bosilevac JM, Fach P, Beutin L (2017) Shiga Toxin-Producing Serogroup O91 *Escherichia coli* Strains Isolated from Food and Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology** 83: 1–13.

Gérard F, Pradel N, Wu LF (2005) Bactericidal activity of colicin V is mediated by an inner membrane protein, SdaC, of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology** 187: 1945–1950.

Guabiraba R, Schouler C (2015) Avian colibacillosis : still many black holes. **FEMS Microbiology Letters** 362: 1–8.

Havarstein LS, Holo H, Nes IF (1994) The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. **Microbiology** 140: 2383–2389.

Hejair HMA, Ma J, Zhu Y, Sun M, Dong W, Zhang Y, Pan Z, Zhang W, Yao H (2017) Role of outer membrane protein T in pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Research in Veterinary Science** 115: 109–116.

Hiroi M, Yamazaki F (2012) Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Food-Producing Animals. **Journal of Veterinary Medical Science** 74: 189–195.

Holt KE, Wertheim H (2015) Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* , an urgent threat to public health. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 112: E3574–E3581.

Hu J, Torres AG (2015) Enteropathogenic *Escherichia coli*: Foe or innocent bystander? **Clinical Microbiology and Infection** 21: 729–734.

Jacoby GA, Munoz-Price LS (2005) The New Beta Lactamases. **The New England Journal of Medicine** 352: 380–391.

Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S (2017) Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications — a review. **Journal of Applied Microbiology** 123: 570–581.

Jeong YW, Kim TE, Kim JH, Kwon HJ (2012) Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. **Journal of Veterinary Science** 13: 145–152.

Joensen KG, Tetzschner AMM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F (2015) Rapid and Easy In Silico Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. **Journal of Clinical Microbiology** 53: 2410–2426.

Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK (2008) Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology** 46: 3987–3996.

Johnson JR, Stell AL (2000) Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. **The Journal of Infectious Diseases** 181: 261 – 72.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology** 2: 123–140.

Kawano M, Yaguchi K, Osawa R (2006) Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. **Microbiology and Immunology** 50: 961–966.

LeStrange K, Markland SM, Hoover DG, Sharma M, Kniel KE (2017) An evaluation of the virulence and adherence properties of avian pathogenic *Escherichia coli*. **One Health** 4: 22–26.

Liakopoulos A, Geurts Y, Dierikx CM, Brouwer MSM, Kant A, Wit B, Heymans R, Pelt WV, Mevius DJ (2016) A Review of SHV Extended-Spectrum β - Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. **Frontiers in Microbiology** 7: 1257 – 1261.

Liu L, Johnson HL et. al. (2012) Global, regional, and national causes of child mortality: An updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The Lancet** 379: 2151–2161.

Luna-Gierke RE, Griffin PM, Gould LH, Herman K, Bopp CA, Strockbine N, Mody RK (2014) Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. **Epidemiology and Infection** 142: 2270–2280.

Ludrigan MD, Webb RM (1992) Prevalence of *ompT* among *Escherichia coli* isolates of human origin. **FEMS Microbiology Letters** 97: 51–56.

Lynne AM, Skyberg JA, Logue CM, Doetkott C, Foley SL, Nolan LK (2007) Characterization of a Series of Transconjugant Mutants of an Avian Pathogenic *Escherichia Coli* Isolate for Resistance To Serum Complement. **Avian Diseases Digest** 2: e23–e23.

Ma LC, Fang CT, Lee CZ, Shun CT, Wang JT (2005) Genomic Heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* Strains Is Associated with Primary Pyogenic Liver Abscess and Metastatic Infection. **The Journal of Infectious Diseases** 192: 117–128.

Manges AR (2016) *Escherichia coli* and urinary tract infections: The role of poultry-meat. **Clinical Microbiology and Infection** 22: 122–129.

Marcadé G, Deschamps C, Boyd A, Gautier V, Picard B, Branger C, Denamur E, Arlet G (2008) Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 63: 67–71.

Marshall BM, Levy SB (2011) Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews** 24: 718–733.

Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Thayer SG (1998) The Occurrence of Ambient Temperature-regulated Adhesins, Curli, and the Temperature-sensitive Hemagglutinin Tsh among Avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases** 42: 106 – 118.

McEwen SA, Collignon PJ (2018) Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum** 6: 1 – 26.

Melo RCA, Barros EMR, Loureiro NG, Melo HRL, Maciel MAV, Lopes ACS (2014) Presence of *fimH*, *mrkD*, and *irp2* Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology** 69: 824–831.

Melton-Celsa AR (2014) Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. **Microbiology Spectrum** 2: 1–13.

Monroy MAR, Knöbl T, Bottino JA, Ferreira CSA, Ferreira AJP (2005) Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 28: 1–15.

Murase K, Martin P et. al. (2015) *HlyF* produced by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a virulence factor that regulates outer membrane vesicle biogenesis. **Journal of Infectious Diseases** 212: 856–865.

Murphy CN, Clegg S (2012) *Klebsiella pneumoniae* and Type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation, and biofilm formation. **Future Microbiology** 7: 991–1002.

Nakazato G, Campos TA, Stehling EG, Brocchi M, Silveira WD (2009) Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira** 29: 479–486.

Ngeleka M, Pritchard J, Appleyard G, Middleton DM, Fairbrother JM (2003) Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-II/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 15: 242–252.

Ong CLY, Beatson AS, Totsika M, Forestier C, McEwan AG, Schembri MA (2010) Molecular analysis of type 3 fimbrial genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Citrobacter* species. **BMC Microbiology** 10: 34–36.

Orskov F, Orskov I (1992) *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animal. **Canadian Journal of Microbiology** 38: 699–704.

Overdevest ITMA, Heck M et. al. (2014) Extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella* spp. in chicken meat and humans: A comparison of typing methods. **Clinical Microbiology and Infection** 20: 251–255.

Paczosa MK, Mecsas J (2016) *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 80: 629–661.

Paixão AC, Ferreira AC, Fontes M, Themudo P, Albuquerque T, Soares MC, Fevereiro M, Martins L, Corrêa de Sá MI (2016) Detection of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates. **Poultry Science** 95: 1646–1652.

Parreira VR, Gyles CL (2003) A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. **Infection and Immunity** 71: 5087–5096.

Platenkamp A, Mellies, JL (2018) Environment Controls LEE Regulation in Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology** 9: 1–15.

Podschun R, Ullmann U (1998) *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors *Klebsiella* spp. **Journal of clinical microbiology** 11: 589–603.

Projahn M, Tippelskirch PV, Semmler T, Guenther S, Alter T, Roesler U (2019) Contamination of chicken meat with extended-spectrum beta-lactamase producing-*Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* during scalding and defeathering of broiler carcasses. **Journal Of Food Microbiology** 77: 185–191.

Regué M, Hita B, Piqué N, Izquierdo L, Merino S, Fresno S, Benedí VJ, Tomás JN (2004) A gene, uge, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence. **Infection and Immunity** 72: 54–61.

Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK (2005) Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research** 36: 241–256.

Ruth Wang LY, Jokinen CC, Laing CR, Johnson RP, Ziebell K, Gannon VPJ (2018) Multi-year persistence of Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) in a closed canadian beef herd: A cohort study. **Frontiers in Microbiology** 9: 1–24.

Runyen-Janecky LJ, Reeves SA, Gonzales EG, Payne SM (2003) Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc and Feo Iron Acquisition Systems to Iron Acquisition In Vitro and in Cultured Cells. **Infection and Immunity** 71: 1919 – 1928.

Saravanan M, Ramachandran, B, Barabadi H (2018) The prevalence and drug resistance pattern of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *Enterobacteriaceae* in Africa. **Microbial Pathogenesis** 114: 180–192.

Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmiecik A, Frej-Madrzak M, Ksiazczyk M, Bugla-Ploskonska G, Choroszy-Krol I (2019) Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. **Gut Pathogens** 11:1–16.

Scheutz F, Teel LD et. al. (2012) Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology** 50: 2951–2963.

Schouler C, Schaeffer B et. al. (2012) Diagnostic Strategy for Identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* Based on Four Patterns of Virulence Genes. **Journal of Clinical Microbiology** 50: 1673 – 1678.

Shah RK, Ni ZH, Sun XY, Wang GQ, Li F (2017) The Determination and Correlation of Various Genes, ESBL, Serum Bactericidal Effect and Biofilm Formation of Clinical Isolated Classical *Klebsiella pneumoniae* and Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Respiratory Tract Infected Patients. **Polish Journal of Microbiology** 66: 501 – 508.

Shankar C, Veeraraghavan B, Nabarro LEB, Ravi, R, Raghupathi NKD, Rupali P (2018) Whole genome analysis of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates from community and hospital acquired bloodstream infection. **BMC Microbiology** 18:1–9.

Sharapov UM, Wendel AM et. al. (2016) Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7 Infections Associated with Consumption of Fresh Spinach: United States. **Journal of food protection** 79: 2024–2030.

Siqueira AK, Ribeiro MG, Leite DS, Tiba MR, Moura C, Lopes MD, Prestes NC, Salerno T, Silva AV (2009) Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of health dogs. **Research in Veterinary Science** 86: 206 – 210.

Singh P, Sha Q, Lacher DW, Del Valle J, Mosci RE, Moore JA, Scribner KT, Manning SD (2015) Characterization of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and deer in a shared agroecosystem. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 5: 1–13.

Skyberg JA, Horne SM, Giddings CW, Wooley RE, Gibbs PS, Nolan LK (2003) Characterizing Avian *Escherichia coli* Isolates with Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Avian Diseases** 47: 1441 – 1447.

Sorensen TL, Blom M, Monnet DL, Frimodt-Moller N, Poulsen RL, Espersen F (2001) Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. **New England Journal of Medicine** 345: 1161–1166.

Subedi M, Luitel H, Devkota B, Bhattarai RK, Phuyal S, Panthi P, Shrestha A, Chaudhary DK (2018) Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. **BMC Veterinary Research** 4: 4–9.

Tamhankar AJ, Lundborg CS (2019) Antimicrobials and Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Remediation : A Global One Health Perspective. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 16: 1–7.

Tenover FC (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control** 34: S3-10.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2012) Microbiologia. Porto Alegre: Artmed, 934p.

Trung NV, Nhung HN et. al. (2016) Colonization of Enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in chickens and humans in southern Vietnam. **BMC Microbiology** 16: 1–6.

Vo JL, Ortiz GCM, Subedi P, Keerthikumar S, Mathivanan S, Paxman JJ, Heras B (2017) Autotransporter Adhesins in *Escherichia coli* Pathogenesis. **Proteomics** 17: 1–10.

Watkins RR, Bonomo RA (2016) Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America** 30: 313–322.

Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremon A (2013) Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: Toward the globalization of CTX-M. **Clinical Microbiology Reviews** 26: 744–758.

Yassin AK, Gong J et. al. (2017) Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. **PLoS ONE** 12: 1–8.

Younis GA, Elkenany RM, Fouda MA, Mostafa NF (2017) Virulence and extended-spectrum β -lactamase encoding genes in *Escherichia coli* recovered from chicken meat intended for hospitalized human consumption. **Veterinary World** 10: 1281–1285.

Zhao S, Wang CL, Chang SK, Tsai YL, Chou CH (2019) Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Day-old Chicken Fluff in Taiwanese Hatcheries. **Avian Diseases** 63: 1–9.