

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

**CARACTERIZAÇÃO E PADRÕES DE RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DA
CAMA DE FRANGO APÓS TRATAMENTO DE
COMPOSTAGEM**

Juliana Maria Avanci Agostinho
Médica Veterinária

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

**CARACTERIZAÇÃO E PADRÕES DE RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DA
CAMA DE FRANGO APÓS TRATAMENTO DE
COMPOSTAGEM**

Juliana Maria Avanci Agostinho

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em
Microbiologia Agropecuária**

A275c Agostinho, Juliana Maria Avanci
Caracterização e padrões de resistência
antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas da cama de
frango após tratamento de compostagem / Juliana Maria
Avanci Agostinho. -- Jaboticabal, 2018
67 p. : il.; tabs.; fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal
Orientador: José Moacir Marin

1. Produção avícola. 2. Biossegurança. 3. Risco
zoonótico. 4. Fatores de virulência. 5.
Enterobacteriaceae. 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.

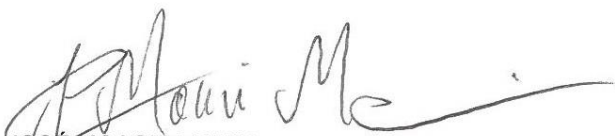
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO E PADRÕES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DA CAMA DE FRANGO APÓS TRATAMENTO DE COMPOSTAGEM

AUTORA: JULIANA MARIA AVANCI AGOSTINHO

ORIENTADOR: JOSÉ MOACIR MARIN

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



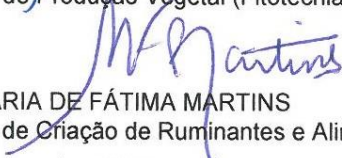
Prof. Dr. JOSÉ MOACIR MARIN

Departamento de Ciências Morfológicas / USP - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto



Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO

Departamento de Produção Vegetal (Fitotecnia) / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MARIA DE FÁTIMA MARTINS

Departamento de Criação de Ruminantes e Alimentação Animal-FMVZ/USP / Pirassununga/SP



Prof. Dr. CLEBER JACOB SILVA DE PAULA

Fafram - Ituverava - SP / Faculdade Dr. Francisco Maeda



Profa. Dra. MÔNICA HITOMI OKURA

Departamento de Ciências Tecnológicas e Exatas-UFTM / Uberaba/MG

Jaboticabal, 13 de dezembro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA MARIA AVANCI AGOSTINHO – Nascida em 28 de março de 1984, em Ribeirão Preto-SP. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Faculdade Doutor Francisco Maeda, Ituverava-SP em agosto de 2009. Concluiu o Programa de Aprimoramento em Medicina Veterinária, nas áreas de Clínica Médica e Clínica Cirúrgica de Animais Domésticos, junto ao Hospital Veterinário da Faculdade Doutor Francisco Maeda, no período de novembro de 2009 a outubro de 2010. De março de 2011 a julho de 2013 cursou Mestrado em Microbiologia Agropecuária na FCAV-UNESP Jaboticabal, com bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq). Em agosto de 2014 iniciou o Doutorado pelo Programa de Microbiologia Agropecuária, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Ninguém conhece as suas próprias capacidades enquanto
não as colocar em prova.**

Publício Siro

Dedico,

Aos meus pais **Antônio Agostinho** (*in memoriam*) e **Vera Lúcia Avanci Agostinho**, por serem meu alicerce e exemplo de caráter, ensinando a verdadeira essência da vida.

A minha irmã **Ana Paula Avanci Agostinho**, que acredita em mim, me apoia e respeita nossa amizade.

Aos meus sobrinhos **Ana Luísa, Benício** e **Bernardo** por trazerem alegria às nossas vidas.

Aos animais, que fazem desse mundo um lugar melhor pra se viver, dando exemplo de amizade, companheirismo, fidelidade e amor verdadeiros.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser presente em todos os momentos da minha vida.

Aos **meus pais**, pela oportunidade de estudo.

Ao professor **Dr. José Moacir Marin**, pela oportunidade que me foi dada, pela orientação, ensinamentos, sabedoria e competência.

Ao **Laboratório Lamounier da Santa Casa de Misericórdia de Ituverava**, em especial à **Ana Paula, Priscila, Cidinha e Aline** pela ajuda e disponibilização do laboratório.

À **Faculdade Dr. Francisco Maeda**, em especial ao Diretor **Dr. Márcio Pereira**, por disponibilizar o local para a realização do experimento.

Ao **Laboratório de Solo da Faculdade Dr. Francisco Maeda**, em especial à **Rosa, Daniela e Ana Paula**, pela colaboração.

Ao **Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinária da Faculdade Dr. Francisco Maeda** pela disponibilização do laboratório.

Às colegas **Marita e Mariana**, pelo auxílio e ensinamentos em biologia molecular.

À amiga **Sara** pela colaboração.

Aos colegas e amigos de trabalho, **Bete, Lílian Moisés e Mariani**, pela paciência.

Aos **funcionários da pós-graduação**.

Aos **docentes do Programa de Microbiologia Agropecuária**.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

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

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 – Produção avícola brasileira	4
2.2 – Cama de frango.....	5
2.3 – Compostagem	10
2.4 – Bactérias isoladas na cama de frango.....	14
2.4.1 – <i>Enterobacter</i>.....	14
2.4.2 – <i>Klebsiella</i>.	15
2.4.3 – <i>Proteus</i>.....	15
2.4.4 – <i>Citrobacter</i>.....	15
2.4.5 – <i>Escherichia coli</i>	16
2.4.5.1 – <i>E. coli</i> patogênica aviária.....	17
2.5 – Fatores de virulência.....	18
2.6 – Antimicrobianos.....	20
2.7.1 – Resistência a antimicrobianos.....	21
2.7.2 – Resistência a antimicrobianos na produção animal.....	22
2.7.3 – Resistência a antimicrobianos em APEC.	23
3 – OBJETIVOS	24
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 – Isolamento bacteriano	25
4.2 – Extração do DNA bacteriano	31
4.3 – Pesquisa de genes de virulência.....	31
4.4 – Testes de susceptibilidade a antimicrobianos	33
5 – RESULTADOS	34
5.1 – Isolamento bacteriano	34
5.2 – Pesquisa de genes de virulência.....	36
5.3 – Testes de susceptibilidade a antimicrobianos	39
5.4 – Análise estatística.....	42

6 – DISCUSSÃO.....	43
7 – CONCLUSÕES	48
8 – REFERÊNCIAS.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de montagem das leiras de cama de frango e pontos de coleta de amostras para análise.....	27
Figura 2 – A: Tubo com meio Rugai Modificado sem inóculo; B: Amostras positivas para <i>E. coli</i> sacarose negativa (à esquerda) e sacarose positiva (à direita) em meio Rugai Modificado.....	28
Figura 3 – Identificação bioquímica de Enterobactérias contendo provas de Indol, LTD, sacarose, glicose, produção de gás, urease, H ₂ S, lisina e motilidade	29
Figura 4 – Termômetro utilizado para mensuras as temperaturas da cama de frango durante o tratamento de compostagem.....	30
Figura 5 – pHmetro de bolso digital utilizado para mensurar o pH da cama de frango durante o tratamento de compostagem.....	30
Figura 6 – Distribuição da frequência de crescimento bacteriano entre as amostras coletadas de cama de frango durante o tratamento de compostagem	34
Figura 7 – Distribuição da frequência de ocorrência de micro-organismos isolados da cama de frango durante o tratamento de compostagem	35
Figura 8 – Avaliação da temperatura (A) e pH (B) no sistema de compostagem. Temperatura (T°); Leira 1 (L1); Leira 2 (L2).....	35
Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação em cadeia de polimerase (PCR) para os genes <i>hlyF</i> e <i>iss</i>	37
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação em cadeia de polimerase (PCR) para os genes <i>iroN</i> , <i>ompT</i> e <i>iutA</i>	37
Figura 11 – Frequência da resistência antimicrobiana de cepas de <i>Escherichia coli</i> obtidas da primeira e da segunda coleta positivas	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – PCR: Combinação de primers para detecção de genes de virulência, temperatura de anelamento e tamanho dos ensaios amplificados.....	33
Tabela 2 – Prevalência dos genes codificadores dos fatores de virulência identificados por PCR em cepas de <i>Escherichia coli</i> provenientes de amostras de cama de frango	38
Tabela 3 – Associação de genes codificadores dos fatores de virulência identificados por PCR em cepas de <i>Escherichia coli</i> provenientes amostras de cama de frango	38
Tabela 4 – Prevalência dos genes codificadores dos fatores de virulência entre as cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas da cama de frango	39
Tabela 5 – Perfil genético das cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas da cama de frango em sistema de compostagem.....	39
Tabela 6 – Frequência de sensibilidade e resistência de cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras de cama de frango durante o tratamento de compostagem.....	40
Tabela 7 – Prevalência de resistência a antimicrobianos entre as cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas da cama de frango em sistema de compostagem.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AMC – Amoxicilina – ácido clavulânico
AMP – Ampicilina
APEC – *Escherichia coli* patogênica avária
BHI – Brain Heart Infusion
CAZ – Ceftazidimine
CFO – Cefoxitina
CFZ – Cefazolina
CIP – Ciprofloxacino
CLO – Cloranfenicol
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
cm – centímetro
C/N – Carbono:nitrogênio
CTX – Cefotaximina
DAEE – *Escherichia coli* difuso-aderente
DEC – *Escherichia coli* diareiogênica
EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa
EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasiva
EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica
ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica
ExPEC - *Escherichia coli* extra-intestinal
FIB – Bactérias indicadoras de contaminação fecal
g – grama
GEN – Gentamicina
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LTD – Desaminação do L-triptofano
mL – mililitro
MNEC – *Escherichia coli* associada a meningite neonatal
NAL – Ácido nalidíxico

NOR – Norfloxacino

NIT – Nitrofurantoína

pb – Pares de base

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reação em cadeia de polimerase

SEPEC – *Escherichia coli* septicêmica

STEC – *Escherichia coli* shigatoxigênica

SUT – Sulfa-trimetoprima

TET – Tetraciclina

uL – Microlitro

UV - Ultravioleta

V – Volt

CARACTERIZAÇÃO E PADRÕES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DA CAMA DE FRANGO APÓS TRATAMENTO DE COMPOSTAGEM

RESUMO – A indústria avícola brasileira gera grandes quantidades de resíduos orgânicos, como a cama de frango, utilizada frequentemente na agricultura. Entre as bactérias presentes neste fertilizante orgânico estão os membros da família Enterobacteriaceae. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de fatores de virulência e resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* da cama de frango na produção comercial de aves de corte. Foi montado um sistema de fermentação similar ao utilizado nas granjas comerciais de frango de corte, sendo coletadas amostras desta cama 5, 10, 15, 30 e 60 dias após o início do tratamento. Um total de 47 cepas de *Escherichia coli* foi isolado e testado por meio da reação em cadeia da polimerase para detectar genes de virulência característicos de APEC (*hlyF*, *iss*, *ompT*, *iroN* e *iutA*). Além disso, foram realizados testes de susceptibilidade a 14 antimicrobianos. Os resultados indicaram que as cepas apresentaram genes característicos de *E. coli* patogênica aviária (APEC), sendo os genes *hlyF*, *iss* e *ompT* os mais prevalentes. Os isolados apresentaram alta resistência (>50%) à tetraciclina, gentamicina, cefotaxima, nitrofurantoína e ampicilina. Estes resultados sugerem que as estirpes possuem genes de virulência e resistência que podem ser disseminados no ambiente, representando um potencial risco zoonótico para os seres humanos.

PALAVRAS-CHAVE: produção avícola, biossegurança, risco zoonótico, fatores de virulência, Enterobacteriaceae.

CHARACTERIZATION AN ANTIMICROBIAL RESISTANCE PATTERNS OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM POULTRY LITTER AFTER COMPOSTING

ABSTRACT – The Brazilian poultry industry generates large amounts of organic waste, such as chicken litter, which is often used in agriculture. Among the bacteria present in organic fertilizer are members of the Enterobacteriaceae family. The objective of this study was to analyze the profile of virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from poultry litter in commercial plants production. A fermentation system similar to that used in commercial chicken farms was set up, and samples of this litter were collected 5, 10, 15, 30 and 60 days after the start of treatment. A total of 47 *Escherichia coli* strains were isolated and tested through Polymerase chain reaction to detect virulence genes característicos de APEC (*hlyF*, *iss*, *ompT*, *iroN* e *iutA*). Antimicrobial susceptibility testing was performed using 14 antimicrobials. The results indicated that our strains harbored genes characteristic of Avian Pathogenic *E. coli* (APEC), with the *hlyF*, *iss* and *ompT* genes being the most prevalent. The isolates showed high resistance (>50%) to tetracycline, gentamicin, cefotaxime, nitrofurantoin and ampicillin. These findings suggest that our strains harbored virulence and resistance genes which can be spread in the environment and are a potential zoonotic risk for humans.

KEYWORDS: poultry production, biosafety, zoonotic risk, virulence factors, Enterobacteriaceae.

1 – INTRODUÇÃO

A atividade avícola é considerada como uma parcela importante da economia brasileira, sendo o país, um dos maiores produtores e exportadores de carne de frango do mundo (USDA, 2018). Como medida para diminuir a carga de resíduos orgânicos gerados pela produção avícola, os agricultores reutilizam estes resíduos como fertilizante. O uso deste resíduo, se submetido a uma compostagem ou fermentação incompletas, como fertilizante orgânico em lavouras pode causar infecções de origem alimentar associadas ao consumo de frutas ou legumes frescos contaminados com bactérias (OLAIMAT e HOLLEY, 2012). Portanto, é necessário avaliar este fator de risco para identificar os possíveis efeitos da contaminação nas áreas de produção (HAHN, 2004).

A compostagem é um processo aeróbio microbiano controlado, que converte material orgânico biodegradável em um produto estável semelhante ao húmus (FURTULA et al., 2010). Após a constante deposição de fezes pelos frangos no material orgânico que serve de base no assoalho da granja (serragem, palha de arroz, etc.) também conhecido como cama de frango, este resíduo torna-se um ótimo substrato para a manutenção e desenvolvimento de uma grande e diversificada população microbiana. Alguns desses microrganismos são de grande preocupação para a saúde pública e qualidade do meio ambiente já que podem contaminar o solo e as fontes de água, infectando humanos e outros animais através de contato e consumo de alimentos ou água contaminados (PUNO-SARMIENTO et al., 2014).

Estudos têm indicado que os patógenos presentes na cama de frango têm a capacidade de sobreviver em habitats secundários (por exemplo, adubos, solos e água) por semanas ou até meses, com sobrevivência dependendo do organismo e condições biológicas, químicas e físicas do solo (ISHII et al., 2010). Bactérias indicadoras de contaminação fecal (FIB) são frequentemente utilizadas como uma medida de presença de contaminação, pois estão presentes na concentração de 10^5 a 10^7 células/grama de solo. Entre elas, *Escherichia coli* é considerada uma importante FIB (COOK et al., 2014).

Escherichia coli é encontrada na microbiota normal do trato gastrointestinal de humanos e animais. No entanto, em aves algumas cepas são conhecidas por serem patogênicas e são denominadas Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Estas cepas causam colibacilose em aves, sendo esta doença responsável por significativas perdas econômicas na indústria avícola (FURTULA et al., 2010). Em humanos, *E. coli* patogênicas também conhecidas como Extra intestinal *Escherichia coli* (EXPEC) podem causar diversas doenças, incluindo infecções do trato urinário, septicemia e meningite neonatal (JOHNSON et al., 2008). Os intestinos das aves têm sido considerados como reservatórios de *E. coli* patogênica com potencial zoonótico que poderia ser transferido diretamente de aves para humanos (EWERS et al., 2009).

As APEC são consideradas um importante agente infeccioso presente na moderna indústria mundial de aves, causando a cada ano perdas econômicas, na ordem de milhões de dólares, à indústria avícola. Os fatores de virulência relevantes das APEC incluem a resistência a componentes do sistema complemento, adesão da bactéria a mucosas e a capacidade de sequestrar ferro do sangue e dos tecidos do hospedeiro. Não há consenso sobre como definir o patotipo da APEC quanto às características de virulência. No entanto, estudos mostraram a presença de cinco genes que agem como preditores mais comuns encontrados (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT*), e podem indicar se a cepa de *E. coli* tem grande potencial de causar doenças extra-intestinais em aves (JOHNSON et al., 2008, STELLA et al., 2016).

Estudos indicam estreita relação entre APEC e isolados de *E. coli* associados à doença extra-intestinal em humanos, então uma melhor compreensão da APEC poderia trazer benefícios não apenas para a saúde dos animais, mas também para a saúde humana (JOHNSON et al., 2008). As linhagens de ExPEC aviárias e humanas demonstram características semelhantes em termos de genes de virulência e grupos filogenéticos. Isto leva à hipótese de que *E. coli* aviária pode servir como reservatório para genes de resistência ou pode colonizar o trato intestinal de humanos (JOHNSON et al., 2012).

Agentes antimicrobianos têm sido utilizados em animais de produção. No entanto, o aumento de bactérias resistentes a antibióticos, tanto em humanos como em animais, gerou uma preocupação significativa em relação à qualidade dos

alimentos (ASAI et al., 2014). Suspeita-se que as fezes de frango sejam fontes de patógenos de origem alimentar e / ou bactérias resistentes a antimicrobianos para seres humanos (MARSHALL e LEVY, 2011). Bactérias multirresistentes são frequentemente encontradas em aves domésticas (JOHNSON et al., 2012). Estas bactérias podem ter sido selecionadas devido a intensa pressão seletiva devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos na avicultura como aditivos alimentares ou como terapia (MARSHALL e LEVY, 2011).

Tendo em vista a importância da cama de frango como resíduo e utilização na produção avícola e agrícola e a similaridade genética entre cepas de *E. coli* entre aves e humanos, o presente estudo tem como objetivos isolar e identificar cepas de *E. coli* provenientes da cama de frango de corte, durante e após o tratamento de fermentação, avaliar a susceptibilidade das bactérias isoladas -in vitrol frente a 14 agentes antimicrobianos e estudar a prevalência de genes codificadores de fatores de virulência das cepas obtidas.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Produção avícola brasileira

A atividade avícola é considerada como uma parcela importante da economia brasileira, sendo o país, um dos maiores produtores e exportadores de carne de frango do mundo. Para o ano de 2018, há uma estimativa que a produção de carne de frango deverá crescer 2,6%, podendo chegar a 13,5 milhões de toneladas (USDA, 2018). De acordo com dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), o efetivo nacional de galináceos atingiu 1,4 bilhão de cabeças no ano de 2017, crescimento de 6% em comparação ao ano anterior. Deve-se destacar que, na década de 70, eram necessários 70 dias para o crescimento e engorda de um frango de corte, que consumia cerca de 2 kg de ração para obter 1 kg de ganho de peso. O ciclo de produção atual confere um ganho de peso de 2,4 kg de peso vivo para o abate, aos 42 dias (GIROTTI; MIELE, 2004).

Apesar de a indústria avícola brasileira enfrentar ritmos mais lentos de exportação e provável aumento nos custos de produção, a demanda doméstica irá impulsionar o crescimento da produção da carne de frango brasileira. Isso devido à recuperação econômica no país, menor inflação e um aumento projetado de 3% no Produto Interno Bruto. Assim, os preços da carne de frango deverão permanecer competitivos com os da carne bovina e suína, estando a concorrência mais acirrada com a carne de boi (ABPA, 2018).

Isso se deu devido à mudança de hábitos de consumo de proteína animal. Hoje se prefere a ingestão de proteínas nobres, de fácil digestão, carnes com baixo teor de gorduras e ricas em vitaminas e magnésio, além de fácil aquisição por todas as classes sociais pelo seu baixo custo (BOTTEZINI; CORSO; VEIT, 2005).

Os custos de produção da carne de frango têm aumentado, reduzindo, assim, as margens de lucro dos produtores brasileiros. A principal causa para o aumento destes custos está relacionada com a redução da produção de milho em

relação a 2017, sendo que o milho representa 70% do custo da produção de carne de frango (USDA, 2018).

A previsão para as exportações de carne de frango é de uma baixa para o ano atual. Apesar disso, devido ao impacto negativo da Influenza Aviária, os embarques deverão se expandir em cerca de 1,5%, ou seja, considerando que em 2017, o Brasil exportou 4,1 milhões de toneladas de carne de frango, em 2018 o volume exportado pelo país poderá chegar a 4,150 milhões de toneladas, superando as 4,125 milhões de toneladas exportadas em 2016 (ABPA, 2018).

Esta previsão de baixa nas exportações para 2018 está relacionada ao prejuízo à credibilidade do serviço de inspeção de carnes do Brasil, derivado do impacto adverso da Operação –Carne Fracal durante o primeiro semestre de 2017. Além disso, outras dificuldades são enfrentadas pelos exportadores brasileiros: as exigências de que todos os caminhões que transportam aves destinadas à países da União Européia precisam ser inspecionados por um auditor fiscal federal agropecuário; e a investigação anti-dumping da China sobre as importações de frangos de corte brasileiros (USDA, 2018).

Os principais destinos para os produtos avícolas do Brasil em 2018 deverão ser os países asiáticos e do Oriente Médio / Norte Africano, principalmente Egito, Emirados Árabes Unidos e Kuwait, sendo que as exportações para o Oriente Médio e África do Norte provavelmente chegarão a 40% das exportações de frangos de corte em 2018. Além disso, exportadores brasileiros estão otimistas em relação a dois mercados recentemente abertos para a carne de frango: México e Chile (ABPA, 2018).

2.2 – Cama de frango

A alta concentração de aves para suprir tanto o mercado interno quanto o externo tem gerado uma alta concentração de resíduos durante os ciclos de produção, sendo a cama de frango o principal resíduo obtido após o período de alojamento. Este substrato utilizado no piso dos galpões avícolas para proporcionar

conforto às aves, isolando-as do piso e diminuindo a umidade gerada pelas excretas, é uma fonte rica de nitrogênio não proteico (SORBARA et al., 2000). Também conhecida como cama de aviário, é composta por dejeções e penas de galináceos, restos de rações e pelo material absorvente da umidade usado sobre o piso do galpão, podendo ser cepilho de madeira ou maravalha, palha, casca de amendoim, café ou arroz, casca de arroz, sabugo de milho triturado, polpa de citrus, vários tipos de gramíneas, incluído bagaço de cana, entre outros (HAHN, 2004; SONODA 2011).

Este material de origem vegetal usado para forrar o piso do aviário, deve possuir uma espessura variando de 0,05 a 0,10m de altura com 0,6 a 1,2cm à espessura da partícula (STEPHENSON; McCASKEY, RUFFIN, 1990; GUPTA; BOROWIEC; OKOH, 1997; ROSA et al., 2008). Além de proporcionar conforto às aves, seu uso também tem a finalidade de controlar o nível de umidade, controlar a produção de pó e amônia, diminuir a exposição dos animais à agentes transmissores de doenças e prevenir a proliferação de insetos (ÂNGELO et al., 1997).

Paganini (2004) cita que a cama de frango é um dos itens relacionados ao sucesso da produção avícola, pois um alojamento que proteja os animais das intempéries, permita bom fornecimento de alimentação e que apresente sanidade adequada fundamentais para que as aves atinjam o seu máximo potencial genético. A finalidade da cama é proporcionar conforto às aves, permitindo que a qualidade de sua carcaça seja mantida, diminuindo a incidência de lesões em regiões como o peito e coxim plantar, bem como em outras áreas do corpo com menor valor comercial (OLIVEIRA; GOULART; SILVA, 2002).

Os problemas diretamente relacionados à cama estão ligados ao ambiente proporcionado às aves. A temperatura, umidade e volatilização de amônia, podem determinar condições de estresse por calor e problemas respiratórios para as mesmas, interferindo nas condições de ambiência e bem-estar dentro do galpão (FURLAN et al., 2000).

Apesar da cama do galpão para criação de frangos poder ser constituída por várias fontes, a maravalha de pinus é a mais aceita e recomendada por ser um material com alta capacidade de absorção e secagem, boa condição microbiológica

e facilidade de manejo. Desta forma, para seleção de uma boa cama deve-se levar em conta que o material a ser utilizado apresente características como baixo custo e alta disponibilidade, ter capacidade de amortecimento, baixa condutividade térmica, liberar facilmente para o ar a umidade absorvida e ser de tamanho médio (material picado ou triturado) (ÁVILA; MAZZUCO; FIGUEIREDO, 1992).

Dentre os materiais que podem ser utilizados como cama de frango, a maravalha, constituída por partículas de tamanho aproximado de 3cm, produzida pelo beneficiamento de madeiras como pinheiro, pínus, bracatinga, canela, cedro, etc., apresenta bom poder de absorção, e sua disponibilidade acompanha a demanda das regiões de indústrias madeireiras e campos de reflorestamento; o feno de gramíneas como coast cross, braquiária, colonião, capim Rhodes, gordura e demais gramíneas utilizadas para pastagem, tem alta disponibilidade, são facilmente produzidos, apresentam boa absorção e proporcionam conforto às aves em razão de sua alta capacidade de amortecimento; a casca de arroz apresenta restrição quanto ao seu uso por ter baixa capacidade de absorção e por ser composta de partículas pequenas, podendo ser ingeridas pelos animais, causando intoxicações; a casca de amendoim é um material que apresenta propriedades absorventes, de boa compressão e homogeneidade, restringindo-se o uso, no caso de excesso de umidade, pois pode vir a apresentar contaminação pelo fungo *Aspergillus flavus* ou *Aspergillus fumigatus*, levando as aves a um quadro de aspergilose (ÁVILA; MAZZUCO; FIGUEIREDO, 1992; NEME et al., 2000).

Diversos fatores podem influenciar a composição física e química da cama de aviário. Entre eles, o número de lotes criados na mesma cama, tipo e quantidade de material utilizado como substrato, idade de abate dos animais, densidade de confinamento, conversão alimentar, tipo de alimento dos frangos, sistema de bebedouros, umidade do material absorvente, quantidade de sujidades, tipo de piso, método de limpeza e armazenamento e as condições climáticas ocorridas durante a criação, (JACOB et al., 1997; EDWARDS e DANIEL, 1992).

Considerando-se que a quantidade média de cama produzida com diferentes tipos de material é de 2,12 kg por ave (ÂNGELO et al., 1997), há uma produção de cerca de 5,7 milhões de toneladas de cama de frango por ano.

Em relação à epidemiologia de doenças, a cama de frango tem papel importante, pois recebe todas as excretas das aves, possuindo alta carga microbiana, tanto de bactérias quanto de fungos e vírus. Desta forma, torna-se uma potencial fonte de contaminação para a propagação e perpetuação de doenças. Durante o ciclo de produção, as dejeções dos animais são misturadas ao material usado como substrato, sendo que no final do ciclo, a cama de frango pode ser retirada ou reaproveitada no lote seguinte (EDWARDS e DANIEL, 1992). Para ser viável economicamente, é reutilizada por vários lotes. No entanto, a reutilização da cama em lotes sucessivos dificulta a desinfecção do ambiente alterando a qualidade microbiológica do sistema de produção (WALTER, 2000). Este fator pode contribuir para a prevalência de micro-organismos no ambiente (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002).

Desta forma, produtos químicos e biológicos como cal apagada ou extinta (SINGH et al., 1990), sulfato de alumínio (MOORE et al., 1995), bissulfeto de sódio (POPE e CHERRY, 2000), gesso agrícola (PROCHONOW et al., 2001) e o *Bacillus subtilis* têm sido testados por pesquisadores com o intuito de melhorar a qualidade microbiológica da cama. O *Bacillus subtilis* é um produto biológico e possui enzimas proteases que atuam sobre os dejetos dos animais e a matéria orgânica presentes na cama, essas bactérias utilizam os dejetos como fonte nutricional, reduzindo, assim, os níveis de amônia, melhorando assim, as condições ambientais gerais dentro do aviário (BRITO e TAGLIARI, 2007).

Logo, o confinamento total, sistema de exploração avícola predominante, com altas densidades, gera um volume considerável de dejetos que contaminam o ambiente pela excreção excessiva de nitrogênio, fósforo e microminerais como zinco e cobre. O tratamento e destino adequados desses dejetos têm sido grande preocupação de pesquisadores, técnicos e produtores, tentando buscar soluções para reduzir o impacto ambiental desses resíduos. Desta forma, as formas mais utilizadas para minimizar este problema é a utilização da cama como fertilizante (KONZEN, 2003).

A cama de frango foi utilizada em larga escala na alimentação animal. Isso se deu devido à sua alta disponibilidade e baixo preço de aquisição, valor nutritivo como suplemento protéico, além de níveis apreciáveis de macro e microminerais. O

teor de proteína bruta pode chegar até 28%, dos quais 45% estão na forma de nitrogênio não protéico e 41% na forma de aminoácidos. Dos aminoácidos presentes, a glicina aparece em maior porcentagem, encontrando-se a arginina, lisina e metionina em quantidades menores (FONTENOT e WEBB, 1974). Porém, esse tipo de material teve seu uso restringido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio da Instrução Normativa nº 08 datada de 25 de março de 2004, que proibiu o uso de produtos de origem animal na alimentação animal (BRASIL, 2004).

Esta decisão foi tomada porque este resíduo pode conter ingredientes de origem animal provenientes da ração desperdiçada dos comedouros pelos frangos, sendo possível que os bovinos, ao ingerirem esta cama, passem a ser portadores da doença conhecida como Encefalopatia Espongiforme Bovina (Síndrome da Vaca Louca).

A utilização da cama de frango na alimentação de bovinos contraria a proposta de produção de carne bovina brasileira sem a presença de ingredientes da dieta com origem animal frente ao comércio exterior. Além deste aspecto, outros inconvenientes do uso da cama de aviário na alimentação de ruminantes são apontados: presença de toxinas produzidas por bactérias (toxina botulínica produzida por *Clostridium botulinum* e aflatoxinas produzidas por *Aspergillus flavus* ou *A. fumigatus* quando o material usado no piso do galpão é a casca de amendoim). hipocalcemia, algumas enfermidades infecciosas produzidas por *Salmonella* e coliformes, a intoxicação por cobre, amônia, resíduos de substâncias químicas e os acidentes pela presença de corpos estranhos (OLIVEIRA, 1997; ORTOLANI e BRITO, 2001).

Outro aspecto que também vem sendo considerado para a diminuição destes resíduos é a modificação da dieta da ave, com o objetivo de reduzir a excreção de elementos poluentes, por meio do fornecimento de dietas mais balanceadas e do uso de aditivos em rações (enzimas, por exemplo). Essa alternativa visa melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes contidos nos alimentos pelos animais, evitando o impacto ambiental da excreção excessiva, sobretudo de nitrogênio, fósforo, cobre e zinco, entre outros (SILVA et al., 2006).

Já que apenas 45% do nitrogênio consumido pelas aves são retidos como proteína animal e 55% do nitrogênio ingerido são excretados, contribuindo para aumentar a poluição ambiental, atualmente com a produção industrial de aminoácidos, é possível diminuir o teor de proteína das rações para frangos de corte, mantendo-se o mesmo desempenho das aves, por meio da formulação de rações com base no conceito de proteína ideal (CAUWENBERGHE e BUNHAM, 2001). Porém, pesquisas sobre a redução do teor de proteína bruta e a suplementação de aminoácidos essenciais em rações para frangos de corte têm indicado diminuição no ganho de peso, piora na conversão alimentar e aumento na quantidade de gordura abdominal dos animais (WALDROUP, 2000; SABINO et al., 2004; COSTA et al., 2001).

2.3 – Compostagem

De acordo com Brake (1992) e Haga (1999), a compostagem é um processo biológico controlado onde resíduos orgânicos são estabilizados e convertidos em um produto que pode ser utilizado como fertilizante orgânico. O objetivo é acelerar a decomposição do material orgânico desde que se tenham condições ótimas para o desenvolvimento microbiano, sendo a temperatura, aeração, umidade, relação carbono:nitrogênio (C/N) e nutrientes, os fatores que mais interferem no processo (COSTA et al., 2005).

O composto resultante da compostagem é um material inodoro, com baixa temperatura, de fácil manejo e estocagem e livre de patógenos. Porém, durante o processo há perda de nitrogênio e outros nutrientes do produto final (TIQUIA e TAM, 1998; SWEETEN, 1998).

Nesse sentido, a perda de nitrogênio através da volatilização da amônia (NH₃) é um dos maiores efeitos negativos da compostagem de dejetos de origem animal, reduzindo o valor fertilizante destes resíduos quando utilizados na agricultura. Assim, a umidade e a relação C/N são importantes para o sucesso do

processo, onde uma baixa relação C/N favorece a liberação de amônia e uma relação C/N maior que 75% inibe o início de compostagem (GRAY et al., 1971).

Além disso, a porcentagem de matéria seca da cama tem grande influência na sua taxa de decomposição, já que a liberação de calor durante o processo leva à evaporação da água presente na cama. Desta forma, a umidade do material deve ser mantida entre 60 e 80% para que ocorra o processo (RYNK et al., 1991).

A compostagem é um processo relativamente rápido de biodegradação, levando de 4 a 6 semanas para estabilização do material. No Brasil, recomenda-se um vazio sanitário entre os lotes de duas semanas, fazendo com que o processo de compostagem seja incompleto (SWEETEN, 1998).

Em relação à temperatura do processo, a Agência Americana de Proteção Ambiental especifica que operações de compostagem devem atingir a temperatura mínima de 55°C por três dias consecutivos de fermentação da cama, sendo que para a cama enleirada devem ser atingidas temperaturas maiores que 55°C por no mínimo 15 dias (US-EPA, 2003). Porém, os resíduos de criação de frango podem conter 70 a 80% de água, podendo resultar na redução das temperaturas do processo de compostagem, formação de odores e produção de compostos orgânicos voláteis (TURAN et al., 2007).

A presença de compostos orgânicos na atmosfera produz maus odores, podendo ser nocivos, causando irritação nos olhos e garganta, danos ao fígado e sistema nervoso central, além de apresentarem efeito carcinogênico (DAS et al., 2004).

De acordo com Hahn (2004), o processo de decomposição da cama de frango antes de sua aplicação no solo permite a transformação biológica da matéria orgânica em compostos inorgânicos, conferindo-lhe elevada qualidade como fertilizante e menores impactos negativos ao ambiente. Quando este processo é realizado através do amontoamento da cama, pela necessidade de limpeza do aviário, tendo predomínio de um ambiente anaeróbio, é denominado fermentação. Já quando a cama recebe aeração pelo revolvimento da mesma ou adição de materiais que aumentam as trocas gasosas, é denominado compostagem. Em ambos os processos, o produto resultante da decomposição apresenta características físicas, químicas e biológicas diferentes das do material que lhe deu

origem devido às inúmeras transformações físico-químicas, desencadeadas principalmente pelos micro-organismos.

Para eliminar os micro-organismos patogênicos e resíduos de substâncias químicas da cama de frango, a prática da decomposição tem papel fundamental através da ação do binômio temperatura e tempo de exposição, além do papel bactericida da amônia liberada, ação de antibióticos produzidos por alguns micro-organismos e a competição microbiana, sendo este último um fator importante no controle de patógenos, já que a população nativa de micro-organismos da cama é superior a dos patógenos. (HANH, 2004).

Deve-se ressaltar que mesmo que a processo de decomposição seja eficaz na melhoria sanitária da cama de frango, o uso da mesma na lavoura não isenta o aparecimento de problemas ambientais. A disponibilidade de nutrientes do resíduo e do solo, as necessidades nutricionais das culturas, as características topográficas e as condições climáticas no momento da aplicação continuam sendo critérios imprescindíveis que devem ser respeitados para evitar a contaminação ambiental. Nesse sentido, o manejo que é dado à cama de aviário deve ser rigoroso. Normalmente este manejo é feito através da retirada e ensacamento do material ou amontoamento da cama no galpão ou na lavoura em pilhas, cobrindo-as com uma lâmina de polietileno (lona plástica) para evitar a infiltração da água da chuva. Desta forma, a cama intensifica seu processo de decomposição, que termina quando há redução da temperatura nas pilhas (HAHN, 2004).

De acordo com a Instrução Normativa 007, de 17 de maio de 1999 do Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 1999), o uso da cama de frango só é permitido após sua devida fermentação e desde que não apresente substâncias tóxicas. Porém, não são especificadas a maneira que essa fermentação deve ser feita, sua duração e o que seriam estas substâncias tóxicas. Desta forma, empresas certificadoras criaram orientações específicas para o uso desse resíduo nas propriedades, onde algumas exigem tratamento por um período de tempo extremamente longo e outras proíbem o seu uso, já que não é realizada fiscalização nas propriedades.

Há situações em que produtores aplicam a cama de frango no solo sem ter sido realizado o processo de decomposição. Isto pode ocorrer devido a falta de

espaço para estocagem do material, o período de limpeza do aviário coincide com o preparo do solo e plantio das lavouras, ou o agricultor desconhece ou não considera a decomposição da cama de frango como uma medida importante na redução dos riscos de contaminação ambiental (HAHN, 2004).

Hahn (2004) descreve o processo de decomposição da cama de aviário. Durante o tratamento ocorrem três processos metabólicos: respiração aeróbia, fermentação e respiração anaeróbia. Esta atividade biológica se dá pela ação de enzimas presentes nas fezes das aves e posteriormente, produzidas pelos micro-organismos. A respiração aeróbia é o processo inicial da decomposição, onde há maiores concentrações de oxigênio. Esta fase envolve a conversão de constituintes orgânicos complexos (proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios) em glicose, ácidos orgânicos, ácidos graxos, álcoois e aminoácidos livres, entre outros produtos, reduzindo o pH. Devido à intensa decomposição dos compostos orgânicos durante a respiração aeróbia, há uma grande liberação de energia dos compostos orgânicos na forma de calor (temperaturas podem chegar até 70-80°C). É nesse momento que as altas temperaturas estão agindo na eliminação de patógenos e substâncias químicas.

A segunda fase, o processo metabólico que geralmente predomina é a fermentação. Os compostos que não foram oxidados na primeira fase são utilizados por micro-organismos. Neste processo, há liberação de apenas parte da energia contida no composto original, sendo que há diminuição na produção de calor com a redução das temperaturas.

Já o terceiro processo metabólico presente numa decomposição é a respiração anaeróbia. Este processo, chamado de desnitrificação, é intermediado por micro-organismos facultativos.

O aumento da temperatura é a primeira e uma das principais indicações de que se iniciou a decomposição. Altas temperaturas são um bom indicador de uma alta intensidade e velocidade de decomposição do material orgânico. As perdas de calor de uma pilha de decomposição podem acontecer através de dois mecanismos: pela perda de vapor d'água e pela transferência de calor sensível (MacGREGOR et al., 1981).

2.4 – Bactérias isoladas na cama de frango

Por ser uma fonte de proteína mais acessível e barata, a cadeia produtiva da carne de frango depende da biossegurança e da qualidade dos produtos que são ofertados à população. Desta forma, a qualidade microbiológica dos produtos avícolas deve ser monitorada de forma intensa. A microbiota intestinal das aves é composta de inúmeras espécies bacterianas, formando um sistema complexo e dinâmico (SILVA e SALVINO, 2000). Desta maneira, as aves têm sido consideradas como importante fonte de disseminação das bactérias intestinais para o meio ambiente e deste para o homem, podendo haver uma população diversificada de micro-organismos na cama dos galpões, sendo alguns destes potencialmente patogênicos para as aves e para o homem (CARVALHO et al., 2001).

Os coliformes, representados pelos gêneros, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Hafnia*, *Citrobacter* e *Escherichia* fermentadores de lactose da família Enterobacteriaceae, são frequentemente utilizados como indicadores higiênico-sanitário no controle da qualidade de água e alimentos. Contudo, sabe-se que estes são os micro-organismos mais comumente encontrados em contaminações na produção avícola (ICMSF, 1983).

2.4.1 – *Enterobacter*

De acordo com Sanders e Sanders (1992), *Enterobacter* sp. são bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, pequenas, gram-negativas, anaeróbias facultativas e sem motilidade. São amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em água doce, solo, esgoto, plantas, vegetais, animais e fezes de seres humanos. Podem ser patogênicas oportunistas estando relacionadas a infecções urinárias e, ocasionalmente, septicemias e meningite (HOLT et al., 1994).

2.4.2 – *Klebsiella*

Pertencente à família Enterobacteriaceae, é uma bactéria gram-negativa, encapsulada e imóvel. É isolada normalmente da flora intestinal normal de humanos e animais (KRIEG e HOLT, 1984). De acordo com Murray et al. (1998), a espécie mais comumente isolada desse gênero é a *Klebsiella pneumoniae*. Pode estar presente nas vias respiratórias e nas fezes de indivíduos saudáveis, porém é encontrada em infecções respiratórias e urinárias (KRIEG e HOLT, 1994).

Esta classe de micro-organismos é oportunista, podendo causar bacteremia, pneumonia, infecções do trato urinário, metrite, e mastites, sendo o trato gastrointestinal o principal reservatório e fonte de infecção (KRIEG e HOLT, 1994).

A presença da cápsula aumenta a virulência desse micro-organismo (MURRAY et al., 1998), além de algumas cepas produzirem uma enterotoxina que promove hipersecreção de líquidos e eletrólitos na luz intestinal provocando diarreia (JAWETZ et al., 1982).

2.4.3 – *Proteus*

Micro-organismos do gênero *Proteus* são normalmente encontrados na microbiota intestinal do homem e dos animais, solo e água (O'HARA et al., 2000; STAHL et al., 1981; COKER et al., 2000). São bactérias gram-negativas, pertencentes à família Enterobacteriaceae, possuindo mobilidade através de estruturas denominadas de flagelos. São consideradas patógenos oportunistas (STAHL; WILLIAMS, 1981; COKER et al., 2000).

2.4.4 – *Citrobacter*

Pertencentes à família Enterobacteriaceae, são bastonetes gram-negativos e fazem parte da microbiota intestinal de humanos e animais. Podem ser oportunistas, frequentemente associadas à sepse e meningite neonatal. Também podem estar associadas a pneumonias, que ocorre quase exclusivamente em neonatos e indivíduos imunossuprimidos. Foram descritos pela primeira vez em 1932 por Werkman e Gillen, sendo que em 1977, foram identificadas as espécies: *C. freundii*, *C. amalonaticus* e *C. diversus* (SUSAN et al., 2008).

2.4.5 – *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa, em forma de bastonete, pertencente a família Enterobacteriaceae, encontrada no trato gastrointestinal de mamíferos e aves (SOKJA e CARNAGHAM, 1961; KAPER et al, 2004). São mesófilas, crescendo de 18°C a 44°C, com temperatura ótima de 37 a 40°C. É anaeróbia facultativa, possuindo metabolismo respiratório e fermentativo, podendo ser móvel ou imóvel (SUSSMAN, 1997).

Algumas estirpes de *E. coli* têm sido envolvidas em doenças que acometem humanos e animais. A capacidade de causar doença é devido à atributos de virulência característicos, sendo classificadas em patotipos (CROXEN e FINLAY, 2010; KAPER et al, 2004).

As linhagens de *E. coli* são classicamente distribuídas em dois grandes grupos principais: as linhagens diarreiogênicas (DEC), que causam infecção intestinal; e as linhagens extraintestinais (ExPEC), que ocasionam um amplo espectro de enfermidades fora do ambiente intestinal. As DEC são geralmente divididas, de acordo com as combinações distintas de fatores de virulência, em seis patotipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* Shigatoxigênica (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difuso-aderente (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998; CROXEN e FINLAY, 2010).

Já as estirpes extraintestinais são geneticamente e epidemiologicamente distintas das estirpes comensais e patogênicas intestinais (JOHNSON et al., 2002). Sua denominação reflete seu sítio de isolamento e não suas características em relação aos seus fatores de virulência. Desta forma, *E. coli* são divididas em: UPEC (*E. coli* uropatogênica), isoladas de infecção urinária; MNEC (*E. coli* associada a meningite neonatal), isoladas de meningites; SEPEC (*E. coli* septicêmica), isoladas de septicemias; e APEC (*E. coli* patogênica aviária), isoladas de colibacilose aviária (JOHNSON e RUSSO, 2002a; SMITH et al, 2007; PITOUT, 2012).

2.4.5.1 – *Escherichia coli* patogênica aviária

Algumas estirpes de *E. coli* possuem atributos de virulência específicos que concedem à bactéria a capacidade de ocasionar doença extra-intestinal em aves. Infecções causadas por estas *E. coli* (*Escherichia coli* patogênica aviária-APEC), resultam em significativa morbidade e mortalidade na indústria avícola, causando prejuízos em todas as áreas de criação de aves (DHO-MOULIN e FAIRBROTHER, 1999; BARNES et al, 2008).

Estão presentes na microbiota intestinal e outras superfícies mucosas de aves domésticas e selvagens, podendo também ser isoladas do ambiente de criação das aves (BARNES et al, 2008).

Apesar de não estar totalmente definida, especula-se que a via natural da infecção por APEC, sejam as vias orais e respiratórias (DZIVA e STEVENS, 2008).

As cepas de APEC podem ser classificadas tanto pela estrutura antigênica (O; K; H), quanto através de técnicas fenotípicas como hemaglutinação, ensaio de aderência em cultura de células, ensaio para detecção de hemólise, dentre outras (BARNES et al, 2008). Além disso, técnicas de biologia molecular estão sendo empregadas com frequência para a caracterização de virulência de amostras de APEC (EWERS et al., 2004; JOHNSON et al., 2008b; SCHOULER et al., 2012).

Quanto a quais genes seriam os marcadores de virulência das cepas de APEC ainda não existe um consenso. Porém a proposta de Johnson et al. (2008)

sugere que uma cepa seja classificada como APEC conforme a posse de cinco genes plasmidiais: *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT*. Segundo estes autores, esses genes são comuns às cepas de APEC com alta patogenicidade.

Escherichia coli extraintestinais compartilham fatores de virulência comuns às cepas UPEC, NMEC e APEC (EWERS et al., 2007). Estudos reportam que cepas de APEC apresentam-se genética e fenotipicamente semelhantes às ExPEC humanas (ZHAO et al., 2009; TIVENDALE et al., 2010; BAUCHART et al., 2010). Sugere-se que pode existir pouca ou nenhuma especificidade ao hospedeiro entre as cepas de *E. coli* humanas e aviárias e, conseqüentemente, a APEC poderia constituir um risco zoonótico (RODRIGUES-SIEK et al., 2005; EWERS et al., 2007; PEIGNE et al., 2009; CHANTELOUP et al., 2011). Além disso, Ewers et al. (2009) relataram semelhanças entre cepas de APEC, cepas intestinais aviárias e ambientais.

2.5 – Fatores de Virulência

Fatores de virulência são estratégias adotadas pelos micro-organismos para vencer as barreiras imunológicas do hospedeiro e permitir a sua colonização (CALIMAN, 2010). Os mecanismos de virulência de APEC têm sido continuamente estudados e considerados multifatoriais. Vários fatores destes, como adesinas, invasinas, fatores de resistência ao soro, sistemas de aquisição de ferro e toxinas já foram associados à patogenicidade de cepas APEC (BARBIERI et al., 2013; BARBIERI et al., 2014). Esses fatores podem ser encontrados em elementos genéticos, como plasmídeos, transposons, ilhas de patogenicidade e bacteriófagos (FALKOW, 1991).

Johnson et al. (2008) demonstraram que os genes plasmidiais *iutA*, *iroN* (que codificam receptores sideróforos), *iss* (que codifica proteína de resistência ao sistema complemento), *ompT* (que codifica proteína de membrana externa) e *hlyF* (que codifica uma hemolisina putativa de *E. coli* aviária) eram mais frequentes em cepas de APEC do que em cepas fecais em animais saudáveis. Desta forma, foi

sugerido que estes genes poderiam servir como indicadores de patogenicidade de APEC. Porém, apesar da existência de fatores reconhecidos por sua contribuição para a virulência de APEC, ainda não há um marcador definido ou conjunto de marcadores que definam este patotipo (DZIVA e STEVENS, 2008).

A baixa disponibilidade de ferro, essencial para o crescimento bacteriano, afeta a habilidade dos micro-organismos se multiplicarem nos tecidos do hospedeiro (SUSSMAN, 1997). Em resposta a essa deficiência de ferro, escasso em sua forma livre no organismo dos animais, os sistemas sideróforos concedem aos micro-organismos a habilidade de aquisição de ferro (ADLER et al., 2012).

Apesar de apenas um único tipo de sideróforo seja suficiente para a aquisição de ferro, a maioria das cepas APEC expressam vários tipos de sideróforos, sendo eles: aerobactina (*iuc*), yersiniabactina (*fyu* e *irp2*), salmochelina (*iro*) e o sistema *sitABC* (EWERS et al., 2005, 2007; BARNES et al., 2008; JOHNSON et al., 2008 a,b).

Outro fator de virulência associado as APEC é a capacidade de resistência à atividade bactericida do sistema complemento do soro do hospedeiro. Tal habilidade é codificada pelo gene *iss* (increased serum survival) que bloqueia o complexo terminal do sistema do complemento que atuaria na membrana celular causando a opsonização e lise da células bacteriana (JOHNSON et al., 2001; BINNS et al., 1982). O fator *iss* está fortemente associado a virulência de APEC, estando, significativamente, mais presente nestas linhagens do que em linhagens de *E. coli* isoladas de aves saudáveis (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005a).

Uma proteína de membrana externa produzida por *E. coli* desempenha um papel importante de proteção à resposta imunológica do hospedeiro, através da resistência à lise e opsonização pelo complemento, bem como participa da adesão da bactéria ao macrófago e invasão do endotélio cerebral (KIM, 2008; CROXEN; FINLAY, 2010). Esta proteína, denominada Omp, é codificada pelo gene *omp* (*Outer membrane protein*), e está presente na maioria dos isolados de APEC, possuindo funções de adesina e invasina, participa da produção de biofilme, age como marcador imunológico e serve de receptor para vários bacteriófagos (NOLAN et al., 2003; SMITH et al., 2007).

A resposta inflamatória presente nas infecções é causada pela produção de exotoxinas. A hemolisina, uma toxina extracelular, lisa eritrócitos e outros tipos celulares, liberando citocinas, estimulando, assim a resposta inflamatória. Essa hemolisina é codificada pelo gene *hly* localizado em plasmídeos (SAYLERS e WHITT, 2002).

Cepas APEC tendem a ser menos toxigênicas que cepas que afetam os humanos (BARNES et al., 2008). A prevalências de genes que codificam toxinas, como as hemolisinas, codificadas pelo gene *hlyF* nestas espécies, costuma ser baixa (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005 a,b.; EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008b). Porém, alguns genes de toxinas ocorrem em grande número de cepas do patotipo aviário (BARNES et al., 2008).

2.6 – Antimicrobianos

Estudos sobre antimicrobianos tiveram início frente à aceitação da teoria microbiana. A ideia de que doenças infecciosas poderiam ser combatidas pela eliminação dos micro-organismos infectantes gerou a procura pelo homem por substâncias capazes de eliminar ou inibir o crescimento destes micro-organismos. Desta forma, foi impulsionada a busca por drogas eficientes e com baixos efeitos colaterais para a célula hospedeira (WRIGHT, 2007).

Trata-se de uma classe de fármacos utilizada frequentemente tanto em unidades de assistência de saúde humana como veterinária, além de ser usualmente consumida pela comunidade e utilizada em animais de produção como promotor de crescimento ou em práticas de profilaxia (ANVISA, 2010). Quando produzidos naturalmente por micro-organismos, são denominados antibióticos. Já os sintetizados artificialmente são denominados quimioterápicos (TAVARES, 2000; RANG et al., 2007).

A ação de um antimicrobiano depende, primeiramente, da interação deste com a célula hospedeira. Esta interação pode ser iniciada por um processo ativo específico da célula, aumentando a concentração intracelular do antimicrobiano, ou

por difusão passiva, sendo que não há necessidade de ligação específica da droga com componentes intracelulares. Apesar de os mecanismos de ação da maioria dos antimicrobianos não estarem totalmente elucidados, estes podem ocorrer através da inibição da síntese da parede celular, inibição da função da membrana celular, inibição da síntese de proteínas (inibição da tradução do material genético), inibição da síntese de ácidos nucleicos ou ação como antimetabólicos (JAWETZ et al., 1998).

2.7 – Resistência a antimicrobianos

De acordo com Boerlin e White (2006), resistência a um antimicrobiano é a capacidade de um micro-organismo resistir ao efeito de uma concentração geralmente ativa de um antimicrobiano. Esse fenômeno é um dos fatores mais preocupantes relacionados à saúde mundial, pois vem se agravando com grande rapidez em comparação às décadas anteriores (ALMEIDA e PALERMO-NETO, 2005).

A emergência da resistência antimicrobiana, especialmente a multirresistência, é um sério problema de saúde pública, combinando o aumento de sua frequência e severidade e a diminuição do desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos pelas companhias farmacêuticas, tornando-se um desafio à ciência (COHEN, 2000; SIQUEIRA et al., 2008).

Este fenômeno é resultado de mudanças genéticas no micro-organismo, podendo ser por mutação ou transferência genética, sendo esta última caracterizada por aquisição de genes de resistência por conjugação, transformação ou transdução (WALSH, 2003).

O uso indevido e a administração destes fármacos em doses abaixo das indicadas são fatores que podem provocar o aumento da população bacteriana resistente (ANSARI e MALIK, 2009). Este fenômeno é denominado —pressão seletiva. Ou seja, uma população heterogênea de bactérias expostas a um antibiótico leva à eliminação de cepas susceptíveis, sendo que as resistentes

sobrevivem. Desta forma, a capacidade de se multiplicarem exponencialmente, as cepas resistentes geram clones com o mesmo genótipo (KLEIN e FRANZ, 2005).

2.7.1 – Resistência a antimicrobianos na produção animal

Mcewen e Fedorka-Cray (2002) citam que os níveis de resistência a antimicrobianos em bactérias isoladas em diferentes fases da produção animal têm causado grande preocupação nos últimos anos, já que esta classe de fármacos é utilizada indiscriminadamente em terapias e como promotores de crescimento. Esta prática pode selecionar estirpes resistentes tanto de bactérias patogênicas quanto de bactérias da microbiota normal, sendo considerado o fator primordial capaz de favorecer a seleção e a disseminação de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos, isto na medicina humana e na medicina veterinária (BENSKIN et al., 2009).

Alimentos de origem animal são associados à transferência de resistência a antimicrobianos para humanos, além da transmissão direta entre animais e humanos de risco como agricultores e funcionários de abatedouros (VAN DEN BOGAARD e STOBBERINGH, 2000; KLEIN e FRANZ, 2005; BOERLIN e WHITE, 2006). Este primeiro está relacionado com a possibilidade da presença de resíduos de antibióticos na carne, ovo, leite, entre outros; ingestão de bactérias selecionadas por promotores de crescimento utilizados nos animais, que podem transferir a resistência para a microbiota gastrointestinal do homem; e ingestão de patógenos resistentes, causadores de doenças (WALSH, 2003; KLEIN e FRANZ, 2005). As principais classes de antimicrobianos utilizados em animais de produção, tanto em terapias, quanto como promotores de crescimento, apresentam análogos de uso humano, induzindo resistência cruzada aos antibióticos humanos (BOERLIN e WHITE, 2006).

No Brasil, as tetraciclina, penicilinas, cloranfenicol, sulfonamidas, furazolidona e avoparcina foram proibidos como aditivos em rações (BRASIL, 2002), porém levantamentos realizados sobre o uso de antimicrobianos como promotores

de crescimento revelaram que tetraciclina, quinoxalinas, penicilinas e sulfonamidas são utilizadas tanto como promotores de crescimento, quanto terapêuticas na fase final de produção dos frangos (PAMVET, 2005).

Entre as classes de antimicrobianos autorizados como promotores de crescimento de frangos de corte estão: ácido 3-nitro, ácido arsanílico, avilamicina, colistina, flavomicina, loncomicina, tilosina, virginiamicina, bacitracina, espiramicina e enramicina (BRASIL, 2002), sendo que quase todas as rações avícolas contêm algum tipo de antibiótico, para melhorar a conversão alimentar (ENGLERT, 1982).

2.7.2 – Resistência a antimicrobianos em APEC

Através da emergência da resistência a antimicrobianos, o tratamento de infecções causadas por cepas de ExPEC, tanto em humanos quanto em animais, tem sido prejudicado (PITOUT, 2012). O problema parece ser ainda maior em cepas de APEC, que vem apresentando índices de resistência ainda maiores (MANGES e JOHNSON, 2012; MELLATA, 2013), já que antibióticos são usados como promotores de crescimento na cadeia de produção das aves (MANGES e JOHNSON, 2012; PITOUT, 2012; MELLATA, 2013; SZMOLKA e NAGY, 2013). Estudos relatam níveis fenotípicos de multirresistência em APEC acima de 90%, além de resistência a todas as classes de antimicrobianos (ZHAO et al., 2005; WANG et al., 2010; AHMED et al., 2013; MELLATA, 2013).

Nesse sentido, estudos demonstram que linhagens de APEC e linhagens de *E. coli* patogênicas extraintestinais de origem humana compartilham características de virulência (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; EWERS et al., 2007). Esses estudos sugerem que APEC e ExPEC humanas compartilham conteúdos de genes de virulência e capacidade patogênica semelhantes. Essas similaridades indicam que APEC pode atuar como causa de infecção ou como reservatório de genes de virulência para linhagens de ExPEC humanas, constituindo um possível risco zoonótico.

3 - OBJETIVOS

Tendo em vista a importância da cama de frango como resíduo e utilização na produção avícola e agrícola e a similaridade genética entre cepas de *E. coli* entre aves e humanos, o presente estudo tem como objetivos:

- Isolar e identificar cepas de *E. coli* provenientes da cama de frango de corte, durante e após o tratamento de fermentação;
- Avaliar a susceptibilidade das bactérias isoladas –in vitro frente a 14 agentes antimicrobianos;
- Estudar a prevalência de genes codificadores de fatores de virulência das cepas obtidas;

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Isolamento bacteriano

Amostras de cama de frango de casca de amendoim provenientes de duas granjas distintas da região de Ituverava-SP, ambas utilizadas em 3 ciclos de produção, foram misturadas e dispostas em duas leiras de 1,0 metro de comprimento, 1,0 metro de altura e 1,0 metro de largura cada, em pátio de compostagem, constituído de piso de concreto, sendo as leiras umedecidas e cobertas com lona plástica. O intuito foi realizar a fermentação da cama de frango da mesma forma que é feita nas granjas da região.

Foram colhidas amostras de cada leira nos 5, 10, 15, 30 e 60 dias após o início do tratamento numa profundidade de 50 cm, sendo que ao longo de cada leira, foram colhidas 2 amostras de cama em 3 posições diferentes. Todas as amostras foram acondicionadas em placas de Petri e, em seguida, inoculadas na concentração de 2g de cama de frango em 10 mL de meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion), sendo então incubadas em estufa à temperatura de 37°C por 24 horas (Figura 1).

Após esse período, 1 mL da solução foi semeada em placas de Petri com Ágar MacConkey (Mac-Difco Laboratories, Detroit, USA), por esgotamento e incubadas à 37°C por 24 horas. De cada placa foram isoladas 5 colônias que apresentavam características presuntivas de *E. coli* sendo estas submetidas aos testes bioquímicos confirmatórios, de acordo com o sugerido por Koneman et al. (1997), o meio de RUGAI modificado (testes bioquímicos de indol, glicose, sacarose, produção de gás, lisina, motilidade, uréia e H₂S) (Figura 2).

Cada colônia foi semeada em RUGAI modificado pelo método de picada na base do meio associada a técnica de estrias no ápice. Tais amostras foram incubadas por 18 horas à 37°C e então realizou-se a interpretação dos resultados (Figura 3), levando-se em conta a tabela do perfil bioquímico das enterobactérias (KONEMAN et al., 1997), de forma que a produção de Indol é observada no papel

da face interna da tampa após a adição de uma ou duas gotas do reativo de Kovacs, onde aparecimento da cor vermelha indica reação positiva e o não aparecimento indica reação negativa; a LTD (Desaminação do L-triptofano) é observada do ápice até a base da inclinação do meio, sendo que o aparecimento da cor verde garrafa é considerado reação positiva para organismos sacarose negativos e o aparecimento da cor marrom, positiva para os sacarose positivos; a fermentação da sacarose é observada entre o pico da inclinação até a base da mesma, onde o aparecimento da cor amarela indica reação positiva e o não aparecimento, reação negativa; a fermentação de glicose é observada entre a base da inclinação até a fase intermediária, assim a reação foi considerada positiva com o aparecimento da cor amarela no meio; a produção de gás é observada entre a base da inclinação até a fase intermediária, onde o aparecimento de bolhas ou o arredondamento do meio indica que a reação foi positiva e o não aparecimento, negativa; a hidrólise-produção de urease é observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento da cor azul escura indica reação positiva e o meio inalterado, reação negativa; a produção de H_2S é observada entre a base da inclinação até a fase intermediária. O aparecimento da cor preta indica reação positiva e o não aparecimento, reação negativa. A descarboxilação da lisina é observada na fase inferior, sendo que o aparecimento da cor púrpura indica que a reação foi positiva e o aparecimento da cor amarela indica que a reação foi negativa; a motilidade é observada na face inferior. Qualquer crescimento observado além da linha de picada foi considerado positivo.

A temperatura e o pH da cama de frango foram mensurados todos os dias, com auxílio de termômetro (Figura 4) e phmetro digital de bolso (Figura 5), respectivamente, nas profundidades de 30 e 60 cm a partir do topo da leira até o 8º dia de tratamento. Posteriormente, estes parâmetros foram aferidos a cada 4 dias sendo que o revolvimento da cama foi feito com a mesma frequência com o auxílio de enxada e pá para a montagem das leiras com o objetivo de manter a atividade microbiológica que depende da presença do oxigênio.

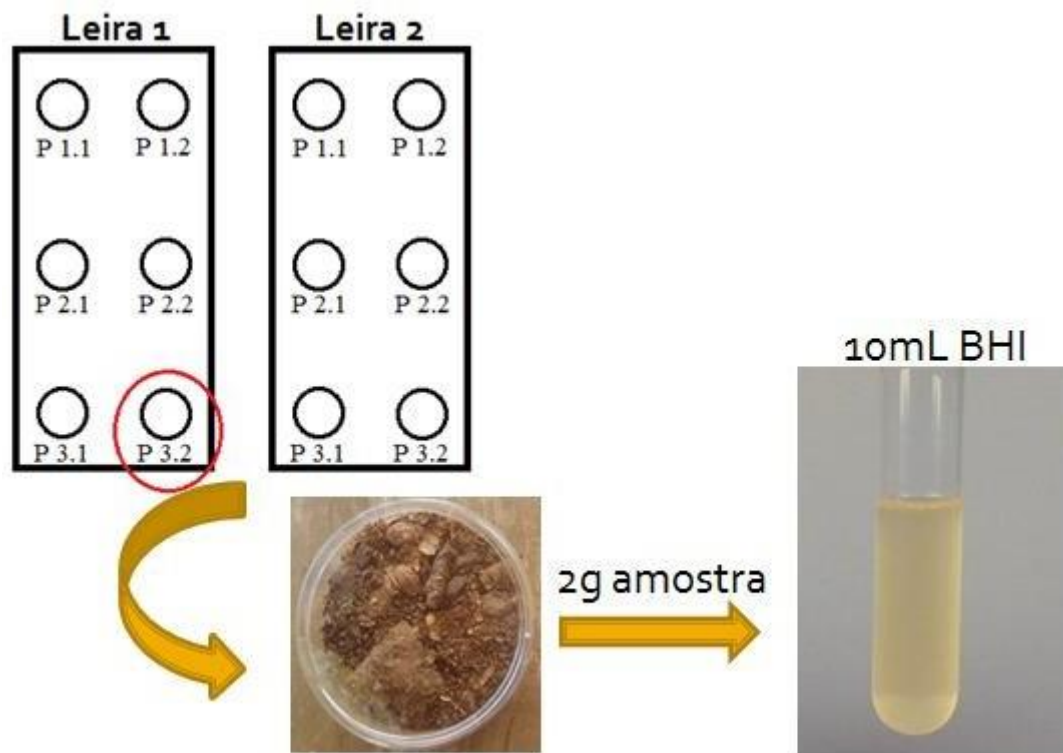


Figura 1 – Esquema da montagem das leiras de cama de frango e pontos de coleta de amostras para análise.

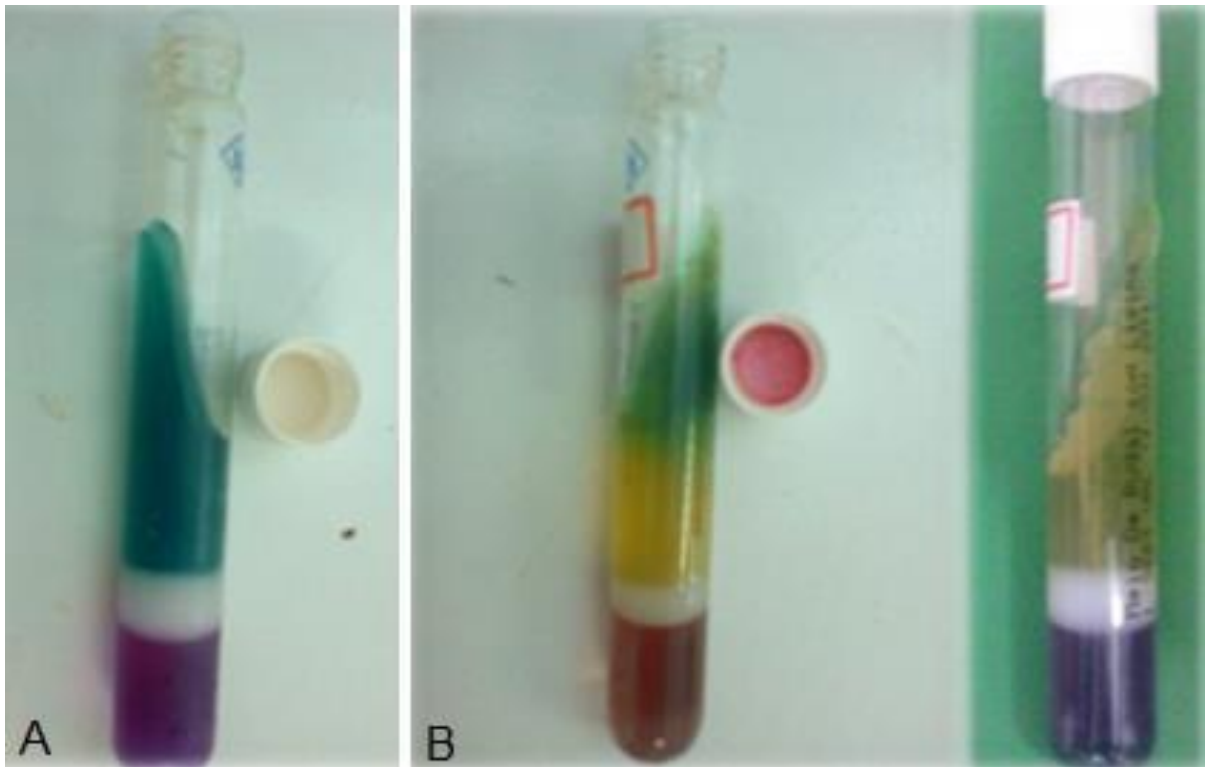


Figura 2 – A: Tubo com meio Rugai Modificado sem inóculo; B: Amostras positivas para *E. coli* sacarose negativa (à esquerda) e sacarose positiva (à direita) em meio Rugai Modificado.

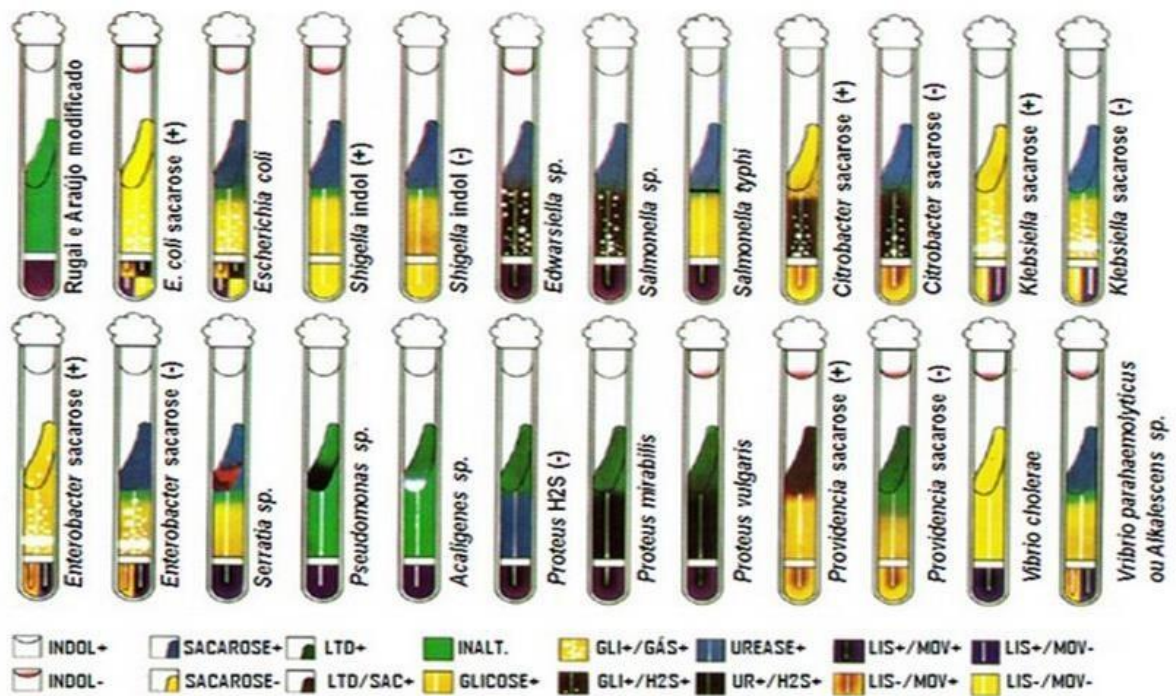


Figura 3 - Identificação bioquímica de Enterobactérias contendo provas de Indol, LTD, sacarose, glicose, produção de gás, urease, H2S, lisina e motilidade. Fonte: Cecon- Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico.



Figura 4 – Termômetro utilizado para mensurar as temperaturas da cama de frango durante o tratamento de compostagem.



Figura 5 – Phmetro de bolso digital utilizado para mensurar o pH da cama de frango durante o tratamento de compostagem.

4.2 – Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano para o procedimento da PCR para a detecção dos genes foi feita segundo técnica proposta por Keskimaki et al. (2001) com pequenas modificações, sendo o DNA liberado do micro-organismo por lise térmica.

Cada amostra de *E. coli* foi incubada à 37°C por 12 horas em um tubo de ensaio contendo meio de cultura Luria Broth (caldo LB). A seguir, 1 mL dessa cultura foi transferido para um eppendorf e submetido à centrifugação a 15000 rpm, para precipitação das células, descartando-se o sobrenadante. As células precipitadas foram ressuspensas em 1 mL de tampão fosfato salino (PBS) e agitadas em vortex por 30 segundos. A cultura bacteriana foi novamente precipitada por centrifugação e o processo de lavagem repetido, dessa vez com 500 µL de água ultrapura Milli-Q (Millipore Corporation, EUA) estéril. Após essa lavagem, o tubo eppendorf contendo a cultura foi colocado por 10 minutos em água fervente para lise da parede celular. Após esse período, as células foram precipitadas através de centrifugação a 14.000 rpm durante 2 minutos e do qual foi retirado uma alíquota de 300 µl do sobrenadante (DNA) e transferido para outro tubo eppendorf. Esse material lisado, foi estocado em freezer a -80°C. O produto oriundo dessa preparação foi utilizado para a realização das PCRs. Logo após a extração do DNA, todas as amostras foram armazenadas em freezer -80°C, em tubos contendo 750 µL de glicerol e 750µL do caldo BHI com a cultura de bactérias para análises futuras.

4.3 – Pesquisa de genes de virulência

Genes codificadores de fatores de virulência foram investigados. Os genes selecionados foram *iutA* (receptor férrico de aerobactina) (JOHNSON et al., 2008), *hlyF* (hemolisina putativa de *E. coli* aviária) (JOHNSON et al., 2008), *iss* (proteína de resistência sérica) (HORNE et al., 2000), *iroN* (gene receptor do sideróforo

salmochelin) (JOHNSON et al., 2006) e *ompT* (gene da protease de membrana externa epissomal) (JOHNSON et al., 2000).

O DNA microbiano foi obtido pela técnica de lise térmica (KESKIMAKI et al, 2001). Os isolados identificados como *E. coli* foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme descrito por Johnson et al (2008).

Para tal, uma alíquota de DNA (4 µL) foi acrescentada à mistura contendo 0,4 µL de dNTP (10 mM), 2 µL de solução tampão 10X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40), 1.6 µL de 25 mM MgCl₂, 0.8 µL de cada primer 10 pM, e uma unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas, Europe). Água MilliQ foi adicionada até completar o volume total de 20µL. Os ciclos consistiram de um estágio inicial a 95°C por 2 minutos, seguidos de 25 ciclos, cada um contendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento com temperatura variando para cada primer por 30 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos. O ciclo de extensão final foi a 72°C por 7 minutos (CHINA et al. 1996). A descrição dos —primersII encontra-se na Tabela 1.

Após cada PCR, acrescentava-se de 5µL de corante de front (0,25% azul de bromofenol em 50% de glicerol) no produto da reação e foi aplicado marcador molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, EUA) em um gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídio (1µg/mL) em tampão Tris-Borato-EDTA (TEB) e separados por eletroforese (70V/1h). Os produtos de amplificação foram visualizados por exposição do gel em luz UV e fotografado.

Tabela 1 – PCR: Combinação de primers para detecção de genes de virulência, temperatura de anelamento e tamanho dos ensaios amplificados.

Genes	Comentários	Sequência (5'-3')	TA (°C)	Tamanho (pb)	Referência
<i>iutA</i>	Sideróforo	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	63	300	Johnson et al., 2008
<i>hlyF</i>	Hemolisina	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC GGCGGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	62	450	Johnson et al., 2008
<i>iss</i>	Resistência ao soro	GTGGCGAAAAGTAGTAAACAGC CGCCTCGGGGTGGATAA	58	760	Horne et al., 2000
<i>iroN</i>	Sideróforo	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT GTTGCGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	60	553	Johnson et al., 2006
<i>ompT</i>	Membrana externa	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC	62	496	Johnson et al., 2008

4.4 – Testes de susceptibilidade a antimicrobianos

A susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de *E. coli* foi realizada utilizando o método padrão de difusão em disco recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2008, 2013). Os antimicrobianos utilizados foram: ácido nalidíxico (NAL, 30 µg); ampicilina (AMP, 10 µg); amoxicilina-ácido clavulânico (AMC, 20 / 10µg); cefoxitina (CFO, 30 µg); cefazolina (CFZ, 30 µg); cefotaxima (CTX, 30 µg); ceftazidima (CAZ, 30 µg); ciprofloxacina (CIP, 10 µg); cloranfenicol (CLO, 300 µg); gentamicina (GEN, 10 µg); nitrofurantoína (NIT, 300 µg); norfloxacin (NOR, 10 µg); trimetoprim-sulfametoxazol (SUT, 1,25 / 23,75 g); tetraciclina (TET, 30 µg).

Cada cepa identificada como *E. coli* foi inoculada com auxílio de swabs estéreis em uma placa com meio ágar Mueller-Hinton e então foram colocados os discos com agentes antimicrobianos de forma equidistante. A leitura foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C, através das medidas dos diâmetros dos halos de inibição obtidas com uma régua milimetrada, segundo a tabela fornecida pelo fabricante dos discos utilizados. O isolado de *E. coli* ATCC 25922 foi utilizado como controle de qualidade para o teste de susceptibilidade antimicrobiana.

5 – RESULTADOS

5.1 – Isolamento bacteriano

Das 60 amostras de cama de frango colhidas nos 5º, 10º, 15º, 30º e 60º dias de compostagem, houve crescimento bacteriano em 39 (65%) (Figura 6).

Destas 39 amostras, foram identificadas 174 cepas, sendo 112 (64,4%) cepas de *Klebsiella*, 47 (27%) cepas de *Escherichia coli*, 8 (4,6%) cepas de *Enterobacter*, 5 (2,9%) cepas de *Proteus* e 2 (1,1%) cepas de *Citrobacter* (Figura 7). Cepas de *E. coli* foram recuperadas somente no 5º (D5) e 15º (D15) dias das amostras de resíduos de ambas as leiras.

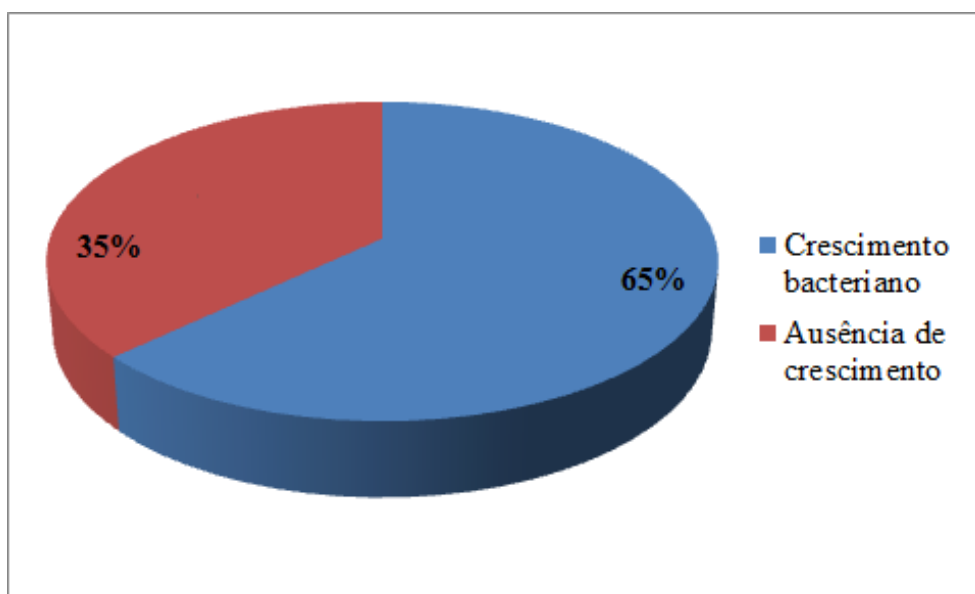


Figura 6 – Distribuição da frequência de crescimento bacteriano entre as amostras coletadas de cama de frango durante o tratamento de compostagem.

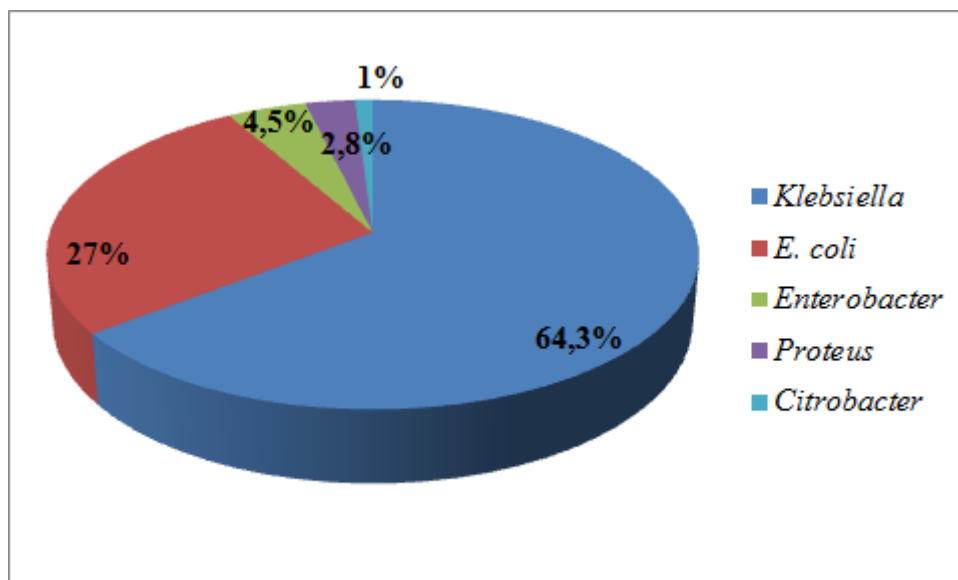


Figura 7 – Distribuição da frequência de ocorrência de micro-organismos isolados da cama de frango durante o tratamento de compostagem.

Em relação às temperaturas e pH, a primeira variou de 26°C a 38°C em ambas as leiras; e o segundo variou de 8.5 a 9.3, com o pH mais alcalino em torno do 18º dia (Figura 8).

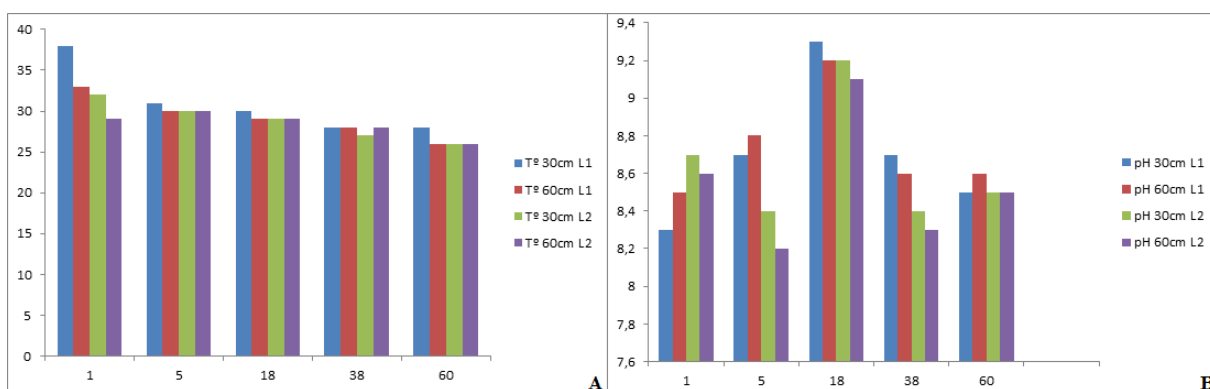


Figura 8 – Avaliação da temperatura (A) e pH (B) no sistema de compostagem. Temperatura (T°); Leira 1 (L1); Leira 2 (L2).

5.2 – Pesquisa de genes de virulência

Um total 47 cepas de *E. coli* isoladas foram submetidas à reação em cadeia de polimerase (PCR) a fim de se detectar a presença de genes precursores de fatores de virulência, sendo estes *hlyF*, *iss*, *ompT*, *iroN* e *iutA* (Figuras 9 e 10).

Dessas 47 cepas, 40 (85%) foram positivas para *hlyF*; 33 (70,2%) para *iss*; 33 (70,2%) para *ompT*; 1 (2,1%) para *iroN*; 26 (55,3%) para *iutA* (Tabela 2). Das 47 estirpes, 40 (85%) apresentaram mais de um fator de virulência, 2 (4,2%) apresentaram apenas um fator de virulência e 5 (10,6%) não apresentaram nenhum dos fatores de virulência testados (Tabela 3).

Tanto na primeira quanto na segunda coleta positiva (5º e 15º dia de compostagem), o gene *hlyF* foi o mais prevalente e esteve presente em 78,7% e 100,0% dos isolados respectivamente; também foi encontrada diferença significativa na maioria dos genes estudados entre as linhagens da primeira e da segunda coleta positiva, com exceção do gene *iutA* ($p > 0,05$) (Tabela 4). Poucas cepas de ambas as coletas foram negativas para genes de virulência, com 4 cepas na primeira coleta e uma cepa da segunda sem a presença de quaisquer genes de virulência. A Tabela 5 mostra que a maioria das cepas apresenta pelo menos dois dos genes pesquisados em ambos os dias de coleta positivas. O perfil mais frequente encontrado na primeira coleta foi *hlyF*, *iss*, *ompT*, *iutA* enquanto que na segunda coleta foi o *hlyF*, *iss*, *ompT*.

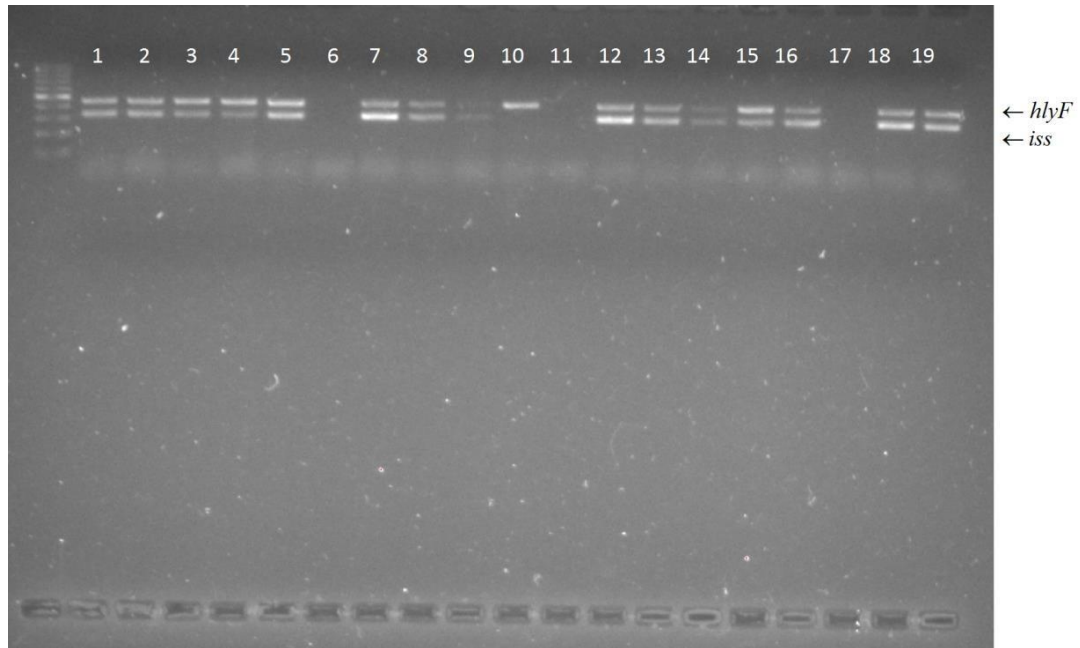


Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação em cadeia de polimerase (PCR) para os genes *hlyF* e *iss*.

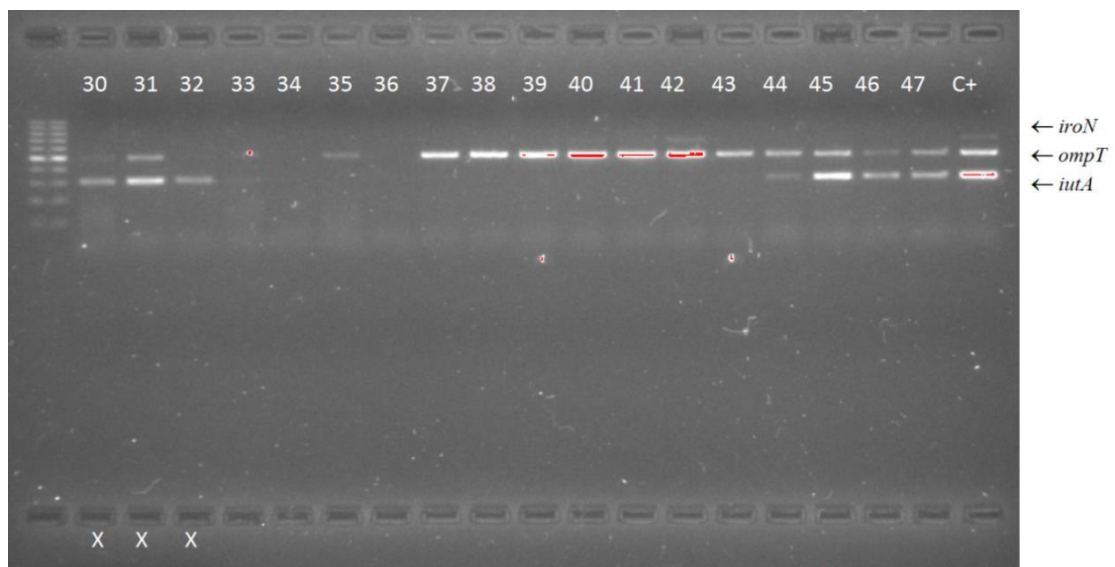


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose de produtos de DNA amplificados através da reação em cadeia de polimerase (PCR) para os genes *iron*, *ompT* e *iutA*.

Tabela 2 – Prevalência dos genes codificadores de fatores de virulência identificados por PCR em cepas de *Escherichia coli* provenientes de amostras de cama de frango durante o tratamento de fermentação.

Gene	Frequência de Prevalência (n=47)
<i>hlyF</i>	40 (85%)
<i>Iss</i>	33 (70,2%)
<i>ompT</i>	33 (70,2%)
<i>iroN</i>	1 (2,1%)
<i>iutA</i>	26 (55,3%)

Tabela 3 – Associação de genes codificadores de fatores de virulência identificados por PCR em cepas de *Escherichia coli* provenientes de amostras de cama de frango durante o tratamento de fermentação.

Número de Associações	Número de Amostras	Genótipo
Nenhum gene	5	---
1 gene	2	<i>iutA</i>
2 genes	6	<i>hlyF ompT</i>
3 genes	17	<i>hlyF iss iutA</i> <i>hlyF iss ompT</i> <i>hlyF ompT iutA</i> <i>hlyF iss iutA</i>
4 genes	17	<i>hlyF iss ompT iutA</i> <u><i>hlyF iss ompT iroN</i></u>

Tabela 4 - Prevalência de genes codificadores de fatores de virulência entre as cepas de *Escherichia coli* isoladas da cama de frango durante o tratamento de fermentação.

Genes de virulência	1ª coleta positiva (D5)	2ª coleta positiva (D15)
	(n=30)	(n=17)
	Isolados (%)	Isolados (%)
<i>hlyF</i>	24 (80)	16 (94)
<i>iss</i>	18 (54)	15 (88,2)
<i>ompT</i>	18 (54)	15 (88,2)
<i>iroN</i>	---	1 (5,8)
<i>iutA</i>	19 (63,3)	7 (41)

Tabela 5 - Perfil genético das cepas de *Escherichia coli* isoladas da cama de frango durante o tratamento de fermentação.

Genes de virulência	1ª coleta positiva (D5)	2ª coleta positiva (D15)
	(n=30)	(n=17)
	Isolados (%)	Isolados (%)
<i>hlyF, iss, ompT</i>	2 (6,6)	7 (41,1)
<i>hlyF, iss, ompT, iutA</i>	10 (33,3)	6 (35,2)
<i>hlyF, iss, iutA</i>	6 (20)	1 (5,88)
<i>hlyF, ompT</i>	5 (16,6)	1 (5,88)
<i>hlyF, ompT, iutA</i>	1 (3,3)	---
<i>hlyF, iss, ompT, iroN</i>	---	1 (5,88)
<i>iutA</i>	2 (6,6)	---
Nenhum	4 (13,3)	1 (5,88)

5.3 – Testes de susceptibilidade a antimicrobianos

Quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, foram avaliadas 47 cepas de *E. coli* isoladas a partir de amostras de cama frango durante o tratamento de compostagem a 14 agentes antimicrobianos.

A nitrofurantoína apresentou o maior percentual de amostras resistentes com 63,8%. Entre os antimicrobianos com maior efetividade *in vitro* estão a cefoxitima (93,6%), o cloranfenicol (89,3%), o ciprofloxacino (85,1%) e a amoxicilina-ácido clavulânico (83%) (Tabela 6).

Das 47 cepas analisadas em relação as 14 drogas antimicrobianas testadas 41 cepas (87,2%) apresentaram multirresistência a 2 ou mais classes de drogas antimicrobianas.

Tabela 6 – Frequências de sensibilidade e resistência de cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de cama de frango durante o tratamento de fermentação.

Antimicrobianos	Sensibilidade		Resistência	
	N	%	n	%
Ácido Nalidíxico	29	61,7	18	38,3
Amoxicilina-ácido clavulânico	39	83	8	17
Ampicilina	23	49	24	51,0
Cefazolina	33	70,2	14	29,8
Cefotaximina	26	55,3	21	44,7
Cefoxitima	44	93,6	3	6,4
Ceftazimina	34	72,3	13	27,6
Ciprofloxacina	40	85,1	7	14,9
Cloranfenicol	42	89,3	5	10,7
Gentamicina	32	68,0	15	32
Nitrofurantoína	17	36,1	30	63,9
Norfloxacina	36	76,6	11	23,4
Sulfa-trimetoprima	26	55,3	21	44,7
Tetraciclina	23	49	24	51,0

n – número de cepas

De acordo com os resultados do teste de susceptibilidade a antimicrobianos, as cepas da segunda coleta positiva (D15) apresentaram maior frequência de resistência em relação às cepas da primeira coleta (D5) para a maioria dos antimicrobianos testados (Figura 11). Em relação à multirresistência, dois isolados apenas na primeira coleta positiva (D5) foram sensíveis a todos aos antimicrobianos testados, enquanto dois isolados na segunda coleta (D15) foram resistentes a onze dos antimicrobianos testados (Tabela 8). A maioria dos isolados em ambas as coletas, 1ª (70,0%) e 2ª (94,1%), apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos.

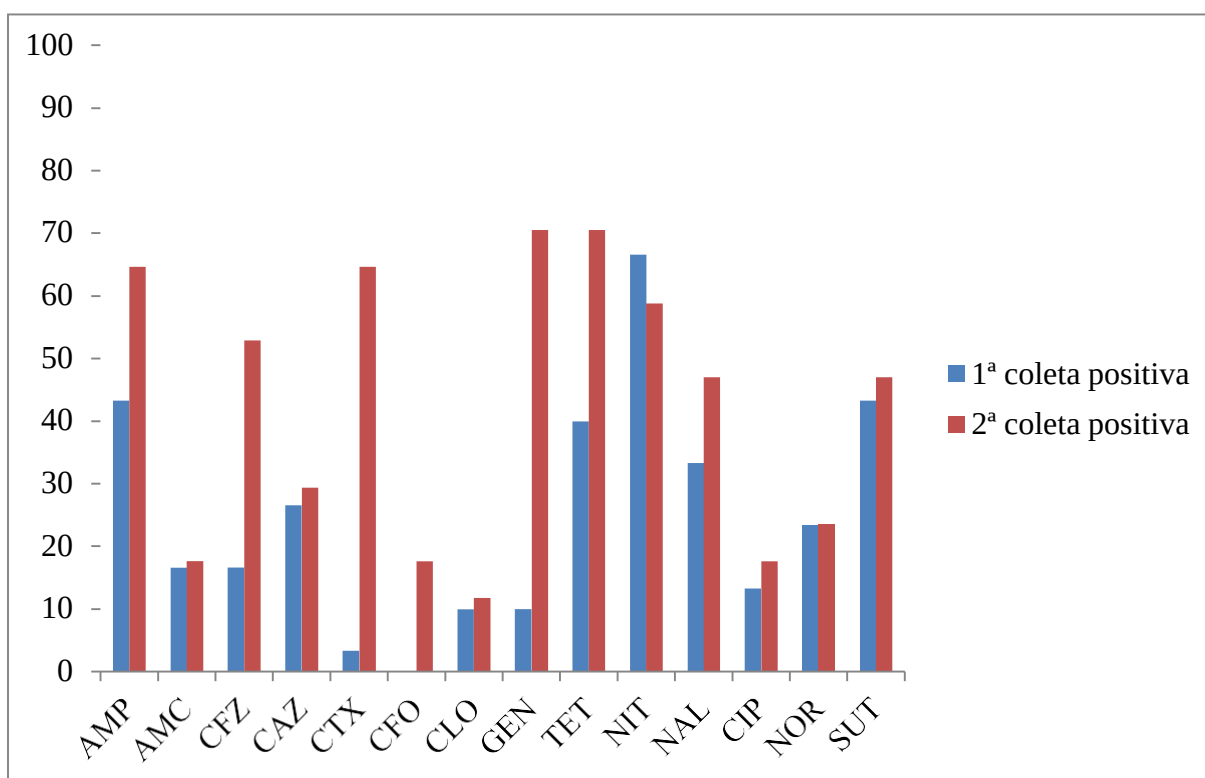


Figura 11 – Frequência da resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* obtidas da primeira e da segunda coleta positivas* Ampicilina (AMP); Amoxicilina-Ácido Clavulânico (AMC); Cefazolina (CFZ); Ceftazidime (CAZ); Cefotaximina (CTX); Cefoxitina (CFO); Cloranfenicol (CLO); Gentamicina (GEN); Tetraciclina (TET); Nitrofurantoína (NIT); Ácido Nalidíxico (NAL); Ciprofloxacina (CIP); Norfloxacina (NOR); Sulfa-Trimetoprima (SUT).

Tabela 7 - Prevalência de resistência a antimicrobianos entre cepas de *Escherichia coli* isoladas da cama de frango durante o tratamento de fermentação.

Prevalência da resistência antimicrobiana	Primeira coleta positiva (n=30)	Segunda coleta positiva (n=17)
	Número de isolados	Número de isolados
Nenhuma resistência detectada	2	---
Resistência para 1 ou 2 antimicrobianos	7	1
Resistência para 3 ou 4 antimicrobianos	7	3
Resistência para 5 a 10 antimicrobianos	14	11
Resistência para 11 a 14 antimicrobianos	---	2

5.4 – Análise estatística

Todas as comparações de frequências entre os diferentes grupos foram realizadas com o teste exato de Fisher e o teste qui-quadrado. Os resultados foram considerados significativos para $p \leq 0,05$. Os testes foram realizados com o programa estatístico R versão 3.1.0 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria).

6 – DISCUSSÃO

Atualmente, a carne de frango é uma das carnes mais consumidas no mundo, e o Brasil é o seu maior exportador mundial e o segundo maior produtor (USDA, 2018). Muitos autores têm relatado que produtos derivados de frangos de granja podem servir como uma fonte de *E. coli* aviária intimamente ligadas à *E. coli* extra-intestinal humana (ExPEC), sugerindo um risco zoonótico (MANGES e JOHNSON, 2012; MELLATA, 2013).

A cama de frango é um valioso potencializador do solo já que é rica em nutrientes, mas também contém um grande número de bactérias entéricas, incluindo *E. coli*, que podem ser potencialmente patogênicas (DIARRASOUBA et al., 2007) e também um reservatório de genes de resistência antimicrobiana que podem ser disseminados no ambiente (HEUER et al. 2011). O processo de compostagem, que visa reduzir a presença de patógenos nos resíduos animais pode não reduzi-los a níveis aceitáveis. Alguns autores relataram que a concentração de *E. coli* era baixa na cama de frango porque a Enterobacteriaceae está em menor parte (<2%) na população bacteriana da cama de frango, o que significa que *E. coli* poderia estar abaixo dos limites de detecção em solos de cama de frango ou no sistema de compostagem (COOK et al., 2014; WINKLER et al., 2017).

Silva et al., (1999) afirmam que o baixo número de cepas de *E. coli* recuperadas da cama de frango no final do ciclo de produção (quando a cama é retirada) está relacionado com a redução do número de enterobactérias no decorrer da idade dos animais, possivelmente devido ao crescimento da microflora intestinal das aves ao qual contribui para inibição de bactérias patogênicas. Outra possível hipótese poderia estar relacionada à ação dos antibióticos utilizados nas aves como promotores de crescimento, já que estes não atuam de forma uniforme contra as bactérias. Já Suzuki (1994) afirma que o amadurecimento do sistema imune e a instalação gradual da microbiota intestinal impedem a colonização do trato digestivo por microorganismos patogênicos.

Oliveira et al., (2004) isolaram enterobactérias patogênicas de fezes de frango em diferentes fases do ciclo de produção relatando a presença de estas em

todos os lotes, observando-se uma ligeira queda no número de isolamentos em relação à idade do frango: *Proteus* sp. (86,7%), *Enterobacter* sp. (66,7%), *Escherichia coli* (60%), *Shigella* sp. (13,3%), *Pseudomonas* sp. (6,7%), *Citrobacter* sp. (6,7%), *Arizona* sp. (6,7%), *Klebsiella* sp. (6,7%) e *Edwardsiella* sp. (3,3%). Estes resultados corroboram com o presente estudo, no qual também não houve predominância de crescimento de *Escherichia coli*.

Martin et al. (1998) relataram a *E. coli* como não detectável na maior parte das amostras de resíduos pesquisadas, o que concorda com a dificuldade de isolar cepas de *E. coli* do sistema de compostagem de aves domésticas no presente estudo, apresentando apenas duas coletas positivas nos 5º e 15º dias. Deve-se ressaltar que o sistema de compostagem utilizado nas granjas comerciais de frango, é realizado durante 7 dias, não havendo manejo do resíduo durante o processo. Assim, é importante ressaltar que os granjeiros estão utilizando este resíduo com presença de contaminação.

Em relação à temperatura e pH da cama, mensurados durante todo o tratamento de fermentação, pôde-se verificar que não houve grande variação entre ambas as medidas. De acordo com Rynk et al. (1991), a liberação de calor durante o processo leva à evaporação da água presente na cama, devendo-se manter a umidade do material para o sucesso do tratamento. No presente estudo, o objetivo foi reproduzir o manejo utilizado nas granjas comerciais para o tratamento de compostagem, no qual o material é coberto e mantido por 7 a 9 dias sem manejo nenhum. Desta forma, a cama de frango do experimento não foi umidificada durante o tratamento, explicando assim a ausência de altas temperaturas.

Um perfil de PCR multiplex voltado para cinco genes (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT*) foi identificado como sendo o mais significativamente associado a APEC altamente patogênica (SYLVESTER e SINGH, 2002). Esses genes também foram encontrados em *E. coli* isoladas de infecção do trato urinário (CYOIA et al., 2015) e também encontrados em plasmídeos conjugativos em cepas de *E. coli* humanas isoladas de sepse no Brasil, indicando possível risco zoonótico (KOGA et al., 2014).

Koga et al. (2015) examinaram cepas de *E. coli* isoladas de carcaças de frango obtidas de frangos de granja e frangos caipiras. Neste estudo, frangos caipiras (*hlyF*-25,7%; *iutA*-17,1%; *iss*-20%; *ompT*-22,9%; *iroN*-2,9%) e frangos de

granja (*hlyF*-47,1%; *iutA*-54,5%; *iss*-35,5%; *ompT*-52,9%; *iroN*-28,9%), apresentaram menores frequência para os genes os genes APEC examinados no presente estudo (*hlyF*-85%; *iutA*-55,3%; *iss*-70,2%; *ompT*-70,2%; *iroN*-2,1%), exceto para o gene *iroN* e *iutA* comparados aos provenientes dos frangos de granja.

Stella et al. (2016) examinaram 91 cepas de *E. coli* isoladas de fezes de frangos saudáveis com resultados (*hlyF*-49.4%; *iutA*-43.0%; *iss*-31.7%; *ompT*-46.0 % *iroN*-22,0%). Estes dados mostram que estes autores também verificaram maior frequência para o gene *iroN* em relação ao presente estudo, porém a frequência do gene *hlyF* em ambos os estudos prevalece como a mais alta em relação aos demais genes testados. Em todas as situações, as cepas de *E. coli* representaram potencial risco zoonótico.

A resistência antimicrobiana em bactérias isoladas de animais de produção está frequentemente associada ao uso de antibióticos na pecuária (MARSHALL e LEVY, 2011; MELLATA, 2013). Apesar do fato de que muitos antimicrobianos como tetraciclina, beta-lactâmicos e quinolonas serem proibidos como promotores de crescimento no Brasil (BRASIL 2003, 2009), a frequência de resistência antimicrobiana entre as cepas de *E. coli* isoladas no presente estudo foi alta para todos esses antimicrobianos. Segundo Koga et al. (2015), as cepas de *E. coli* provenientes de frangos de granja apresentaram maior frequência de resistência antimicrobiana para beta-lactâmicos, cloranfenicol, tetraciclina e quinolonas em relação ao presente estudo, enquanto as cefalosporinas, aminoglicosídeos e nitrofurantoína apresentaram menor frequência de resistência antimicrobiana quando comparado com o presente estudo. Stella et al. (2016) relataram uma frequência de 100% de resistência à cefalotina, eritromicina, estreptomicina, neomicina, ampicilina e amoxicilina. Já Puno-Sarmiento et al. (2014) encontraram cepas provenientes de fertilizante orgânico aviário resistentes a amoxicilina, tetraciclina e sulfonamidas.

Apesar do cloranfenicol ter sido proibido no Brasil em 1998 através da Portaria nº 448 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1998), foi observado um percentual de 10,7% de resistência a este antimicrobiano nas cepas isoladas da cama de frango do presente estudo. Isto sugere que esta condição de resistência encontrada pode estar associada à

capacidade de persistência do cloranfenicol no ambiente, à presença de resíduos em alimentos de origem animal ou se o mesmo continua sendo utilizado indevidamente no país (MACHADO et al., 2015).

A tetraciclina foi o antimicrobiano com maior frequência de resistência na segunda coleta positiva no presente estudo. A alta frequência pode dever-se ao fácil acesso e baixo preço desses medicamentos antimicrobianos e ao baixo monitoramento por órgãos reguladores em medicina veterinária no Brasil, o que também foi relatado por Koga et al. (2015). Dados semelhantes também foram observados em outros países (KANG et al., 2005; JIANG et al., 2011; HASAN et al., 2012).

Os antimicrobianos beta-lactâmicos, especialmente as cefalosporinas de terceira geração, são o tratamento mais utilizado para infecções humanas por Enterobacteriaceae. No entanto, um grande número de bactérias resistentes surgiu em todo o mundo (PITOUT, 2012), o que concorda com a alta frequência de resistência antimicrobiana às cefalosporinas relatadas entre os isolados de *E. coli* no presente estudo e em Stella et al. (2016).

As quinolonas são agentes antimicrobianos de amplo espectro frequentemente usados para infecções entéricas e em terapias do trato urinário humano (PITOUT, 2012). No entanto, a presença de *E. coli* resistente a quinolona em animais tem aumentado (LAI et al., 2014). No presente estudo, os resultados indicam uma alta frequência de resistência ao ácido nalidíxico em cepas isoladas de cama de frango após a compostagem (50,0% na 2ª coleta positiva). Da mesma forma, Koga et al. (2015) relataram alta frequência de resistência ao ácido nalidíxico (70,0%) em isolados de *E. coli* obtidos de frangos de granja; e Puno-Sarmiento et al. (2014) encontraram baixa frequência de cepas resistentes a esse antimicrobiano (6,7%) em cepas provenientes de fertilizante orgânico aviário.

Em relação à multirresistência antimicrobiana em cepas de *E. coli*, o presente estudo mostrou um elevado número de isolados apresentando resistência a três ou mais antimicrobianos (1ª coleta-69,6%; 2ª coleta- 94,1%). A multirresistência também foi observada em cepas de *E. coli* de fezes de frango saudáveis (STELLA et al., 2016) e em carcaças de frango (KOGA et al., 2015).

Nos resultados do presente estudo, é claro que, mesmo com a proibição do uso de muitos antimicrobianos na produção animal, ainda há uma alta frequência de resistência antimicrobiana em cepas recuperadas da cama de frango, o que representa um risco para a disseminação dessa resistência e de genes de virulência através do meio ambiente e também o risco de transmissão para humanos.

7 – CONCLUSÕES

1 – Foi possível isolar 47 cepas de *E. coli* provenientes da cama de frango de corte nos 5º e 15º dias após o início do tratamento de compostagem. A maioria das cepas de *E. coli* isoladas apresentaram fatores de virulência característicos de cepas APEC;

2 – As cepas de *E. coli* isoladas apresentaram um elevado grau de resistência a vários agentes antimicrobianos e foi caracterizado um elevado número de cepas apresentando multirresistência;

3 – As cepas caracterizadas neste trabalho com uma alta frequência de resistência antimicrobiana, associada a vários genes de virulência, mostram que cepas de *Escherichia coli* podem estar presentes em fertilizantes orgânicos após a compostagem da cama de frango representando um risco para a disseminação desses genes no meio ambiente.

8 – REFERÊNCIAS

ABPA (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL). Brasil foi o segundo maior produtor mundial de carne de frango em 2015. **Revista Globo Rural**, 2016. [Online] Disponível em <http://revistagloborural.com/Noticias/Criacao/Aves/noticia/2016/01/brasil-foi-o-2-maior-produtor-mundial-de-carne-de-frango-em-2015-diz-abpa.html> acesso em: 15 de agosto 2018.

ADLER, C.; CORBALAN, N.S.; SEYEDSAYAMDOST, M.R.; POMARES, M.F.; DE CRISTOBAL, R.E.; CLARDY, J.; KOLTER, R.; VINCENT, P.A. Catecholate siderophores protect bacteria from pyochelin toxicity. **PloS one**, v.7, n.10, p.46754, 2012.

AHMED, A.M., SHIMAMOTO, T., SHIMAMOTO, T. Molecular characterization of multirug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. **International Journal of Medical Microbiology**, v.303, n.8, p.475-83, 2013.

ALMEIDA, R.T.; PALERMO-NETO, J. Uso de antimicrobianos em avicultura e o desenvolvimento de resistência bacteriana. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H.S.; GORNIK, S. (Ed.) **Farmacologia aplicada a avicultura: boas práticas no manejo de medicamentos**. São Paulo: Rocca, p. 161-173, 2005.

ANGELO, J.C., GONZALES, E.G., KONDO, N., ANZAI, N.H., CABRAL, M.M. Material de cama: qualidade, quantidade e efeito sobre o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.1, n.26, p.121-130, 1997.

ANSARI, M. I.; MALIK, A. Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, p. 124-132, 2009.

ANVISA. Nota Técnica N. 1/2010: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Online] Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/alertas/item/nota-tecnica-n-01-2010> Acesso em: 15 de agosto de 2018.

ASAI, T., HIKI, M., OZAWA et al., Control of the development and prevalence of antimicrobial resistance in bacteria of food animal origin in Japan: a new approach for risk management of antimicrobial veterinary medicinal products in Japan. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 3, p. 171–176, 2014.

AVILA, V. S.; MAZZUCO, H.; FIGUEIREDO, E. A. P. Cama de aviário: materiais, reutilização, uso como alimento e fertilizante. **EMBRAPA: Circular Técnica**, Concórdia, n 16, 38p, 1992.

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, p. e72322, 2013.

BARBIERI, N.L.; DE OLIVEIRA, A.L.; TEJKOWSKI, T.M.; PAVANELO, D.B.; MATTER, L.B.; PINHEIRO, S.R.S.; VAZ, T.M.; BRITO, B.G.; NOLAN, L.K.; LOGUE, C.M.; HORN, F. Molecular characterization and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with colipticemia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. accepted for publication, 2014.

BARNES, H. J.; NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J. F. Colibacillosis. In: SAIF, Y. M. et al. Diseases of poultry. 12th ed. [S.l.]: **Blackwell Publishing**, p. 691-732, 2008.

BAUCHART, D.; GOBERT, M.; HABEANU, M.; PARAFITA, E.; GRUFFAT, D.; DURAND, D. Influence des acides gras polyinsaturés n-3 et des antyoxidants alimentaires sur les acides gras de la viande et la lipoperoxydation chez le bovine en finition. **Cahiers de Nutrition et de diététique**, 45 (6), 310-309, 2010.

BENSKIN, C. M.; WILSON, K.; JONES, K.; HARTLEY, I. R. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 84, p. 349-73, 2009.

BINNS, M. M. MAYDEN, J., LEVINE, R. P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes traT of R100 and iss of ColV, I-K94. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 2, p. 654-659, 1982.

BOERLIN, P.; WHITE, D.G. Antimicrobial resistance and its epidemiology. In: GIGUERE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. (Eds.). **Antimicrobial therapy in veterinary**. 4th. Ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, p. 626, 2006.

BOTTEZINI, L.M.P.; CORSO, M.P.; VEIT, V.M. Uso de antibióticos na produção de frango. Departamento de Tecnologia em Alimentos – Cefet/PR, 2005.

BRAKE, J. D. A Practical Guide for Composting Poultry Litter. **MAFES Bulletin**, Mississipi, n. 981, p. 9, 1992.

BRASIL (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Portaria nº 448 de 10 de setembro de 1998. Proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações e de aditivos alimentares contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona, em animais cujos os produtos sejam destinados à alimentação humana. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 de setembro de 1998, Seção I, p.38.

BRASIL (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Portaria nº 31 de 29 de janeiro de 2002. Proíbe o uso de princípios ativos a base de arsenicais e antimoniais, na fabricação de produtos destinados à alimentação animal, com finalidade de promotores de crescimento ou melhoradores de desempenho animal. [Online] Disponível em: www.agricultura.gov.br/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/portaria-no-31-de-29-de-janeiro-de-2002.pdf/view. Acesso em: 03 de outubro de 2018.

BRASIL (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa, nº 9 de 27 de junho de 2003. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e susceptível de emprego na alimentação de todos os animais e insetosII. [Online] Disponível em: <https://www.diariodasleis.com.br/legislacao/federal/25330-proibe-a-fabricacao-a-manipulacao-o-fracionamento-a-comercializacao-a-importacao-e-o-uso-dos-principios-ativos-cloranfenicol-e-nitrofuranos-e-os-produtos-que-tenham-estes-principios-ativos-pa.html>. Acesso em: 20 de julho de 2018.

BRASIL (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa, nº 08 de 25 de março de 2004. —Proíbe em todo o território nacional a produção, a comercialização e a utilização de produtos destinados à alimentação de animais que contenham em sua composição proteínas e gorduras de origem animalIII. [Online] Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-8-de-25-de-marco-de-2004.pdf/view>. Acesso em: 08 de setembro de 2018.

BRASIL (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa, nº 26 de 09 de julho de 2009. —Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário, II Instrução Normativa 26. 2009. [Online] Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284>. Acesso em: 20 de julho de 2018.

BRASIL (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa nº 007, de 17 de maio de 1999. Dispõe sobre normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais. [Online] Disponível em: http://ibd.com.br/Media/arquivo_digital/c40fe6c4-51f3-414a-9936-49ea814fd64c.pdf. Acesso em: 08 de setembro de 2018.

BRITO, B. G.; TAGLIARI, K. C. Efeito da utilização de Impacto na ocorrência de celulite em frangos de corte. **A Hora Veterinária**, v. 26, n. 155, p. 13–20, 2007.

CALIMAN, Marly Cristina Wanderley. Estudo de Vigilância Bacteriológica: Isolamento, fatores de virulência e resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de gatos domésticos na região de Ribeirão Preto. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Jaboticabal, 2010.

CARVALHO, A.C.F.B., FLORIOTO, J.F. e SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. *Campylobacter* e *Salmonella* nas fezes e em diferentes tipos de cama de frango. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, 17, 201 – 206, 2001.

CAUWENBERGHE, S. V.; BURNHAM, D. New developments in amino acid protein nutrition of poultry, as related to optimal performance and reduced nitrogen excretion. In: EUROPEAN SYMPOSIUM OF POULTRY NUTRITION, 13., 2001, Blankenberge. **Proceedings...** Blankenberge: 2001.

CHANTELOUP, N.K.; PORCHERON, G.; DELALEU, B.; GERMON, P.; SCHOULER, C.; MOULIN-SCHOULER, M.; GILOT, P. The extra-intestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 invades avian and human epithelial cells and survives intracellularly. **Veterinary Microbiology**, 27; 147 (3-4): 435-439, 2011.

CHERNAKI-LEFFER A. M.; BIESDORF S. M.; ALMEIDA L. M.; LEFFER E.V.B.; VIGNE F. Isolamento de Enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do Estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p. 243–247, 2002.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3462–3465, 1996.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard, CLSI Document M31-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, Pa, USA, 3rd edition, 2008.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23rd informational supplement. CLSI Document M100-S23, CLSI, Wayne, Pa, USA, 2013.

COHEN, M.L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v. 406, p. 762-767, 2000.

COKER C.; POORE C.A.; LI X.; MOBLEY H.L.T. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Urinary Tract Infection. **Microb Infec**, p. 1497-505, 2000.

COOK, G. M.; GREENING, C.; HARDS, K.; BERNEY, M. Chapter One - Energetics of Pathogenic Bacteria and Opportunities for Drug Development. In K. P. Robert (Ed.), **Advances in Microbial Physiology** (pp. 1–62). Cambridge, Massachusetts: Academic Press. 2014.

COSTA, F. G. P.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; GOMES, P. C.; TOLEDO, R. S.; VARGAS JUNIOR, J. G. Níveis dietéticos de proteína bruta para pintos de corte de 1 a 21 e 22 a 42 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1498–1505, 2001.

COSTA, M. S. S. M.; COSTA, L. A. M.; SESTAK, M.; OLIBONE, D.; SESTAK, D.; KAUFMANN, A. V.; ROTTA, S. R. Compostagem de Resíduos da Indústria de Desfibrilação de Algodão. **Engenharia Agrícola**, v. 25, n. 2, p. 540–548, 2005.

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

CYOIA, P. S.; RODRIGUES, G. R.; NISHIO, E. K. et al., Presence of virulence genes and pathogenicity islands in Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, In press. 2015.

DAS, D.; GAUR, V.; VERMA, N. Removal of volatile organic compound by activated carbon filter. **Carbon**, v. 42, p. 2949–2962, 2004.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v.30, n.2-3, p.299-316, 1999.

DIARRASSOUBA, F.; DIARRA, M.S.; BACH, S.; DELAQUIS, P.; PRITCHARD, J.; TOPP, E.; SKURA, B.J. Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms. **J. Food Prot.** 70(6): 1316–1327. PMID:17612058. 2007.

DZIVA, F.; STEVENS, M. P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian Pathol.**, v. 37, n. 4, p. 355-366, 2008.

EDWARDS, D. R.; DANIEL, T. C. Environmental impacts of on-farm poultry waste disposal — A review. **Bioresource Technology**, v.41, p.9-33, 1992.

ENGLERT, S. I. Avicultura: tudo sobre raças, manejo, alimentação e sanidade. **Revista Avicultura**, 4 ed. Porto Alegre: Agropecuária Ltda, 1982.

EWERS, C.; ANTAO, E.M.; DIEHL, I.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. **Appl. Environ. Microbiol.** 75(1): 184–192. 2009.

EWERS, C.; JANBEN, 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, n.1-2, p.91-101, 2004.

EWERS, C.; JANBEN, 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 Diseases**, v.49, n.2, p.269-273, 2005.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ALT, K.; ANTÃO, E.M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIR, T.; BÖHNKE, U. ; STEINRÜCK, H. ; PHILIPP, H.C. ; WIELER, L.H. Avian pathogenic, uropathogenic, newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they ? **Int. J. Med. Microbiology.**, v. 297, p. 163-176, 2007.

FAIRBROTHER, J.M.; GYLES, C.L. *Escherichia coli* infections. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLAIRE, S. et al. (Ed). **Disease of Swine**. Oxford: Blackwell Science, p. 639-674, 2006.

FALKOW, S. Bacterial entry into eukaryotic cells. v.65, n.7, p.1099-1102, 1991.

FONTENOT, J. P.; WEBB, K. E. Poultry wastes as feedstuffs for ruminants. **Federation Procedures...**, v. 33, p. 1936-1937, 1974.

FURLAN, R. L.; MALHEIROS, R. D.; MORAES, V. M. B.; MALHEIROS, E. B; BRUNO, L. D. G.; SECATO, E. R.; MACARI, M. Efeito da densidade de alojamento e da temperatura ambiente sobre a temperatura corporal de frangos. In: Conferência APINCO 2000 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2000, Campinas. **Suplemento da Revista Brasileira de Ciência Avícola**, 2000. p. 62–62. 2000.

FURTULA, V.; FARRELL, E.G.; DIARRASSOUBA, F.; REMPEL, H.; PRITCHARD, J.; DIARRA, M.S. Veterinary pharmaceuticals and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates in poultry litter from commercial farms and controlled feeding trials. **Poult.** 2010.

GIROTTI, A.F.; MIELLE, M. Situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos. **Embrapa Suínos e Aves – Anuário Avicultura Industrial**, n. 11, p. 20-28, 2004.

GRAY, K. R.; SHERMAN, K.; BIDDLESTONE, A. J. A review of composting – part 2. The practical process. **Process Biochemistry**, v. 6, n. 10, p. 22–28, 1971.

GUPTA, G.; BOROWIEC, J.; OKOH, J. Toxicity identification of poultry litter aqueous leachate. **Poultry Science**, v. 76, p. 1364–1367, 1997.

HAGA, K. Development of composting technology in animal waste treatment – review. **Asian – Australian Journal of Animal Science**, v. 12, n. 4, p. 604–606, 1999.

HAHN, L. Processamento da cama de aviário e suas implicações nos agrossistemas. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias – Florianópolis, 2004.

HASAN, B.; SANDEGREN, L.; MELHUS, A.; DROBNI, M.; HERNANDEZ, J.; WALDENSTROM, J.; ALAM, M.; OLSEN, B. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* in wild birds and free-range poultry. Bangladesh. **Emerg Infect Dis**.18:2055–2058. 2012.

HEUER, H.; SCHMITT, H.; SIEMENS, J.; AMELUNG, W.; SMALLA, K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. **Curr Opin Microbiol** 14: 236-545. 2011.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9. ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 787p., 1994.

HORNE, S.M.; PFAFF-MACDONOUGH, S.J.; GIDDINGS, C.W.; NOLAN, L.K. Cloning and sequencing off the *iss* gene from a virulent Avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v.44, n. 1, p.179-184, 2000.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1983). Microorganisms in foods. I. **Their significance and methods of enumerations**. 3ª edição. Toronto: University of Toronto Press. 431p. 1983.

ISHII, S. T.; YAN, H.; VU, D.L.; HANSEN, R.E.; HICKS, M.J.; SADOWSKY. Factors controlling long-term survival and growth of naturalized *Escherichia coli* populations in temperate field soils. **Microbes Environ**. 25:8–14. doi:10.1264/jsme2.ME09172. 2010.

JACOB, J. P.; KUNKLE, W. E.; TERVOLA, R. S.; MILES, R. D.; MATHER, F. B. **Broiler Litter, Part 1: A Feed Ingredient for Ruminants**. University of Florida Cooperative Extension Service, 1997.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia Médica**. 13 ed. [S.1.]: Editora Guanabara Koogan S.A., 568p. 1982.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

JIANG, H.-X.; LU, D.-H.; CHEN et al. High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China. **Veterinary Journal**, vol. 187, no. 1, pp. 99–103, 2011.

JOHNSON, J. R.; OWENS, K. L.; CLABOTS, C.R.; WEISSMAN, S.J.; CANNON, S. B.. Phylogenetic relationships among clonal groups of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as assessed by multi-locus sequence analysis. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1702-1713, 2006.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: –the other bad *E. coli*ll. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 139, p. 155-62, 2002a.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise, **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 261-272, 2000.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L.; DELAVARI, P.; MURRAY, A. C.; KUSKOWSKI M. A.; GAASTRA, W. Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infection in humans. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 897-906, 2001.

JOHNSON, T. J.; GIDDINGS, C. W.; HORNE, S. M.; GIBBS, P. S.; WOOLEY, R. E.; SKYBERG, J.; OLAH, P.; KERCHER, R.; SHERWOOD, J. S.; FOLEY, S. L.; NOLAN, L. K. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**, v.46, p. 342-352, 2002.

JOHNSON, T. J.; LOGUE, C. M.; JOHNSON, J. R.; et al. Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. **Foodborne Pathogens and Disease**, vol. 9, no. 1, p. 37–46, 2012.

JOHNSON, T. J.; SIEK, K. E.; JOHNSON, S. J.; NOLAN, L. K. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 745-758, 2006.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S. C.; NOLAN, L. K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 3987-3996, 2008.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETLOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S.C.; NOLAN, L.K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.12, p. 3987-96, 2008b.

JOHNSON, T.J.; WANNEMUEHLER, Y.; JOHNSON, J.R.; STELL, A.L.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, J.R.; KIM, K.S.; SPANJAARD, L.; NOLAN, L.K. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 22, p. 7043-50, 2008a.

KANG, H.Y.; JEONG, Y.S.; OH, J.Y.; TAE, S.H.; CHOI, C.H.; MOON, D.C.; LEE, W.K.; LEE, Y.C.; SEOL, S.Y.; CHO, D.T.; LEE, J.C. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother.* 55:639–644. 2005.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KESKIMAKI, M.; EKLUND, M.; PERSONEN, H.; HEISKANEN, T.; SIITONEN, A. EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 40, p. 151 –156, 2001.

KIM, K.S. Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. **Nature Reviews Microbiology**, 6: 625-634, 2008.

KLEIN, G.; FRANZ, C.M.A.P. The farm animal as potential reservoir of antibiotic resistant bacteria in the food chain. In: HOLZAPFEL, W.H.; NAUGHTON, P.J. (Ed.). **Microbial ecology in growing animals**. Elsevier Ltd, p. 191-207, 2005.

KOGA, V. L.; TOMAZETTO, G.; CYOIA et al. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. **BioMed Research International**, vol. 2014, Article ID 465054, 9 pages, 2014.

KOGA, V.L.; SCANDORIEIRO, S.; VESPERO, E.C.; OBA, A.; DE BRITO, B.G.; DE BRITO, K.C.T.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R.K.T. Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors among *Escherichia coli* Isolated from Conventional and Free-Range Poultry. **Biomed Research International**, 8p., 2015.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**, 5th Ed. Lippincott, 1395p., 1997.

KONZEN, E. A. **Fertilização de lavoura e pastagem com dejetos de suínos e cama de aves**. EMBRAPA: Informe Técnico, Videira-SC, 2003, 16p. [Online] Disponível em: http://docsagencia.cnptia.embrapa.br/milho/circul31_Fertilizacao_de_lavoura_e_pastagem_com_dejetos.pdf. Acesso em: 08 de setembro de 2018.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**, 9th edn. Williams & Wilkins, Baltimore, 984 p., 1994.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. The espirochetes. In: KRIEG, N.R.; HOLTO, J.G. In: **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. 8 ed. London: Williams & Wilkins, Baltimore, v.1, p. 38-70, 1984.

LAI, J.; WU, C.; WU, C.; QI, J.; WANG, Y.; WANG, H.; LIU, Y.; SHEN, J. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. **Int J Food Microbiol**, 128:904–911., 2014.

MACGREGOR, S.T.; MILLER, F.C.; PSARIANOS, K.M. e FINSTEIN, M.S. Composting process control based on interaction between microbial heat output and temperature. **Applied Environmental Microbiology**, v.41, p.1321-1330, 1981.

MACHADO, A. L.; ARAÚJO, R. L.; SOUSA, O. V.; VIEIRA, R. H. S. F. Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de pescado marinho comercializado na feira livre do Mucuripe – Fortaleza-CE, Brasil. **Bol. Inst. Pesca**, 41(4): 931-943, 2015.

MANGES, A. R.; JOHNSON, J. R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 55, no. 5, pp. 712–719, 2012.

MARTIN, S.A.; MCCANN, M.A.; WALTMAN, I W.D. Microbiological survey of Georgia poultry litter. **J Appl Poult Res** 7, 90–98. 1998.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 24, no. 4, pp. 718–733, 2011.
MCEWEN, S.A.; FEDORKA-CRAY, P.J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical Infectious Diseases**, v.34, n. 3, p. 93-106, 2002.

MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, vol. 10, no. 11, pp. 916–932, 2013.

MOORE, P.A.; DANIEL, T.C.; EDWARDS, D.R. e MILLER, D.M. Effect of chemical amendments on ammonia volatilization from poultry litter. **Journal of Environmental Quality**, v.24, p.293-300, 1995.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Medical microbiology**. 3rd ed. [S.1.]: Mosby, 719p., 1998.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Ver.** v. 11, p. 142–201, 1998.

NEME, R.; SAKOMURA, N.K.; OLIVEIRA, M.D.S.; LONGO, F.A.; FIGUEIREDO, A.N. Adição de gesso agrícola em três tipos de cama de aviário na fixação de nitrogênio e no desempenho de frangos de corte. **Ciência Rural**, v.30, n.4, p.687-692, 2000.

NOLAN, L.K.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; FOLEY, S.L. JOHNSON, T.J.; LYNNE, A.M.; SKYBERG, J. Resistance to serum complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli*. **Vet. Res. Commun**, 27: 101-110, 2003.

O'HARA, C.M.; BRENNER, F.W.; MILLER, M. Classification, Identification and Clinical Significance of *Proteus*, **Providencia**, and **Morganella**. **Clin Microbiol Rev**, p.534-46, 2000.

OLAIMAT, A.N.; HOLLEY, R.A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. **Food Microbiol**. 2012, 32, 1–19.

OLIVEIRA, M. C.; GOURLART, R. B.; SILVA, J. C. N. Efeito de duas densidades e dois tipos de cama sobre a umidade da cama e a incidência de lesões na carcaça de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v.3, n.2, p. 7–12, 2002.

OLIVEIRA, M.D.S. Utilização da cama de frangos na alimentação de bovinos/Mauro Dal Secco de Oliveira. Jaboticabal: FUNEP, 47p., 1997.

OLIVEIRA, W.F.; CARDOSO, W.M.; MARQUES, L.C.L.; SALLES, R.P.R; AGUIAR FILHO, L.C.; TEIXEIRA, R.S.C.; ROMÃO, J.M.; LIMA, A.C.P. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias de amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, p. 211-214, 2004.

ORTOLANI, E. L.; BRITO, L. A. B. Enfermidades Causadas pelo uso Inadequado de cama-de-frango na Alimentação de Ruminantes. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. - Suplemento Técnico, n.22, 2001.

PAGANINI, F.J. Manejo da cama. In: MENDES, A. A.; NÄÄS, I. A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2004. Cap. 7, p. 107–116.

PAMVET-PR. Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frangos de corte, 2005. [Online] Disponível em: www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigilancia%20sanitaria/Relatorio%20levantamento%20frango.pdf. Acesso em: 03 de outubro de 2018.

PEIGNE, S. Predominancy omnivory in European Cave Bears evidenced by a dental microwear analysis of *ursus spelaeus* from goyet, Belgium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 106: 15390-15393, 2009.

PITOUT, J.D.D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 1–7, 2012.

POPE, M.; CHERRY, T.E. Evaluation of the presence of pathogens on broilers raised on poultry litter treatment®-treated litter. **Poultry Science**, v.79, n.9. p. 1351-1355, 2000.

PROCHNOW, L.I.; CUNHA, C.F. KIEHL, J.C.; ALCARDE, J.C. Controle da volatilização de amônia em compostagem, mediante adição de gesso agrícola e superfosfatos com diferentes níveis de acidez residual. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p.65-70, 2001.

PUNO-SARMIENTO, L.E.; GAZAL, L.P.; MEDEIROS, E.K.; NISHIO, R.; KOBAYASHI, K.T.; NAKAZATO, G. Identification of Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains from Avian Organic Fertilizers. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. 211, 8924-8939; doi:10.3390/ijerph110908924, 2014.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER R.J. **Farmacologia**. 6. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RODRIGUEZ-SIEK, K.E.; GIDDINGS, C.W.; DOETKOT, C.; JOHNSON, T.J.; NOLAN, L.K. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**. 36, 241-256, 2005.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, v. 36, p. 241-256, 2005a.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; FAKHR, M. K.; NOLAN, L. K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v. 151, p. 2097-2110, 2005b.

ROSA, J. V.; PRATES, D. F.; WÜRFEL, S. F. R.; CAMACHO, N. N.; COLVARA, J. G.; LIMA, A. S.; SILVA, W. P. Avaliação de *Salmonella* spp. em carcaças de frango resfriadas no Sul do Rio Grande do Sul após implementação do programa de redução de patógenos. In: CONBRAVET - CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35p., 2008, Gramado/RS. **Anais...** 35º Conbravet - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2008.

RYNK, R.; KAMP, M.; WILLSON, G.; SINGLEY, M.; RICHARD, T.; KLEGA, J.; GOUIN, F. **On-Farm Composting Handbook**. Ithaca: Northeast Regional, 1991.

SABINO, H. F. N.; SAKOMURA, N. K.; NEME, R.; FREITAS, E. R. Níveis protéicos na ração de frangos de corte na fase de crescimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 407-412, 2004.

SANDERS, C. C.; SANDERS, W.E., JR. B-lactam resistances in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, 15, 824-39. 1992.

SAYLERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach**. ASM Press, Washington. 2002.

SCHOULER, C.; SCHAEFFER, B.; BRÉE, A.; MORA, A.; DAHBI, G.; BIET, F.; OSWALD, E.; MAINIL, J.; BLANCO, J.; MOULIN-SCHOULER, 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.

SILVA, C.H.P.M.; SALVINO, C.R. Importância do Reconhecimento das Enterobactérias Hospitalares Produtoras de Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e suas Implicações Terapêuticas. **NewsLab** (41): 104-112, 2000.

SILVA, N.; BRAGA, C.E.; COSTA, G.M.; LOBATO, F.C.F. Isolamento e teste de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias em infecções uterinas de éguas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 51, 213 – 216, 1999.

SILVA, Y.L.; RODRIGUES, P.B.; FREITAS, R.T. F.; BERTECHINI, A.G.; FIALHO, E.T.; FASSANI, E.J.; PEREIRA, C.R. Redução de proteína e fósforo em rações com fitase para frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade. Desempenho e teores de minerais na cama. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 840–848, 2006.

SINGH, H.P.; SISHRA, M.; SAHOO, G. Effect of different methods of treatment of used litter on growth, feed efficiency and economies in broiler production. **Indian Journal Production and Management**, v. 6, p. 109–114, 1990.

SIQUEIRA, A. K.; RIBEIRO, M. G.; SALERNO, T.; TAKAHIRA, R. K.; LOPES, M. D.; PRESTES, N. C.; SILVA, A. V. Perfil de sensibilidade e multirresistência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, de piometra e de fezes de cão. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.5, p.1263-1266, 2008.

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.
SOKJA, W. J.; CARNAGHAN, R. B. A. *Escherichia coli* infection in poultry. **Research in Veterinary Science**, v. 2, p. 340-352, 1961.

SONODA, L. T. Reutilização de camas de frango utilizando conceitos de compostagem. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola – Campinas, 2011.

SOKJA, W. J.; CARNAGHAN, R. B. A. *Escherichia coli* infection in poultry. **Research in Veterinary Science**, v. 2, p. 340-352, 1961.

SORBARA, J. O. B.; RIZZO, M. F.; LAURENTIZ, A. C.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; BERCHIELLI, T. T.; MORAES, V. M. B. Avaliação da Polpa de Citros Peletizada como Material para Cama de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 3, 2000. [Online] Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2000000300010. Acesso em: 15 de agosto de 2018.

STAHL.; M.L, WILLIAMS, F.D. Immunofluorescent Evidence of *Proteus mirabilis* Swarm Cell Formation on Sterilized Rat Feces. **Appl Environ Microb.** Mar; 41(3): 801-6, 1981.

STELLA, A.E., DE OLIVEIRA, M.C., FONTANA, V.L.D.S., MALUTA, R.P., BORGES, C.A., ÁVILA, F.A. Characterization and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from feces of healthy broiler chickens. **Arq. Inst. Biol**, v.83, p. 1-5, 2016.

STEPHENSON, A.; McCASKEY, T.; RUFFIN, B. A survey of broiler litter composition and potential value as a nutrient resource. **Biological Wastes**, v. 34, p. 1–9, 1990.

SUSAN, E.; CRAWFORD; ROBERT, S.; DAUM. Bacterial pneumonia, lung abscess, and empyema. *Pediatric Respiratory Medicine*. 2ed. 2008. [Online] Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/citrobacter>. Acesso em: 08 de setembro de 2018.

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

SUZUKI, S. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. **International Journal of Food Microbiology**, 21, 89 – 105, 1994.

SYLVESTER, S.A.; SINGH, S.D. Characterisation and immunizing properties of outer membrane proteins (OMPs) of avian *E. coli*. **Indian Journal of Veterinary Pathology**, 26(1): 109. 2002.

SWEETEN, J. M.; AUVERMANN, B.W. Composting manure and sludge. In: Proc. Natl. Poultry Waste Manage Symposium. **Proceedings...** Department of Poultry Science, The Ohio State University, Columbus, OH, p. 38–44, 1988.

SZMOLKA, A.; NAGY, B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 258, 2013.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 33 (3): 281-301, mai-jun, 2000.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Changes in chemical properties during composting spent litter at different moisture contents. **Agricultural, Ecosystems and Environment**, v.67, p. 688-694, 1998.

TIVENDALE, K.A.; LOGUE, C.M.; KARIYAWASAM, S.; JORDAN, D.; HUSSEIN, A.; LI, G.; WANNEMUEHLER, Y.; NOLAN, L. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. **Infection and Immunity**, 78 (08): 3412-3419, 2010.

TURAN, N. G.; AKDEMIR, A.; ERGUN, O. N. Emission of Volatile Organic Compounds during Composting of Poultry Litter. **Water Air Soil Pollution**, v. 184, p. 177–182, 2007.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura - Brazilian Poultry Association. Relatório Anual 2013—Annual Report 2013. [Online] Disponível em: <http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>. Acesso em: 15 de agosto de 2018.

USDA, 2018. AviNews: avicultura.info. [Online] 08 de set 2018. Disponível em: <https://avicultura.info/pt-br/producao-brasileira-de-carne-de-frango-2018-usda/>.

US-EPA. **EPA/625/R-92/013**: Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. 177p. 2003. [Online] Disponível em:

<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-625-r-92-013.pdf>. Acesso em: 08 de setembro de 2018.

VAN DEN BOGAARD, A.E.; STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 4, p. 327-335, 2000.

WALDROUP, P. W. Nutritional approaches to minimizing nitrogen and phosphorus excretion in broilers. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p.95–108, 2000.

WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. **ASM Press**: Washington, 2003.

WALTER, L. Manejo da cama de frangos de corte e aspectos microbiológicos no ambiente de produção. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE COCCIDIOSE E QUALIDADE INTESTINAL, 2000, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: COCCIFORUM, p.44–54, 2000.

WANG, X.M.; LIAO, X.P.; ZHANG, W.J.; JIANG, H.X.; SUN, J.; ZHANG, M.J.; HE, X.F.; LAO, D.X.; LIU, Y.H. Prevalence of serogroups, virulence genotypes, antimicrobial resistance, and phylogenetic background of avian pathogenic *Escherichia coli* in South of China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 9, 2010.

WERKMAN & GILLEN. *Citrobacter*. In GBIF Secretariat (2017). GBIF Backbone Taxonomy, 1932.

WINKLER, S.; COUFAL, C.; HARMEL, D.; MARTIN, E.; BROOKS, J.P.; POPHAM, S.; GENTRY, T.J. Within-house spatial distribution of fecal indicator bacteria in poultry litter. **Journal of Environmental Quality Abstract – Environmental Microbiology**, 2017.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, March, 2007.

ZHAO, L.; GAO, S.; HUAN, H.; XU, C.; ZHU, X.; YANG, W.; GAO, Q.; LIU, X. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. **Microbiology**, 155: 1634-1644, 2009.

ZHAO, S.; MAURER, J.J.; HUBERT, S., DE VILLENA, J.; MCDERMOTT, P.F.; MENG, J.; AYERS, S.; ENGLISH, L.; WHITE, D.G. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 107, n. 3-4, p. 215-224, 2005.