



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC

CENTRO EDUCACIONAL DO OESTE - UDESC/OESTE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**RASTREABILIDADE GÊNICA E
EPIDEMIOLÓGICA DA *Escherichia
coli* NA CADEIA PRODUTIVA DE
FRANGO DE CORTE**

PEDRO FILIPE DE SOUZA TELES

CHAPECÓ, 2019

PEDRO FILIPE DE SOUZA TELES

RASTREABILIDADE GÊNICA E EPIDEMIOLÓGICA DA *Escherichia coli* NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGO DE CORTE

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**

Orientadora: Prof^ª. PhD. Lenita Moura Stefani
Co-orientador: Prof. Dr. Marcel Manente Boiago

Chapecó, SC, Brasil

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UEDESC,
com dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Teles, Pedro Filipe de Souza
RASTREABILIDADE GÊNICA E EPIDEMIOLÓGICA
DA *Escherichia coli* na CADEIA PRODUTIVA DE
FRANGO DE CORTE / Pedro Filipe de Souza Teles. --
2019.
46 p.

Orientadora: Prof^ª PhD. Lenita Moura Stefani
Co-orientador: Prof. Dr. Marcel Manente Boiago
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2019.

1. Epidemiologia. 2. genes de patogenicidade 3. *pulsed field gel eletrophoresis* 4. saúde pública. I. Stefani, Lenita Moura. II. Boiago, Marcel Manente. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

Universidade do Estado de Santa Catarina
UDESC Oeste
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

RASTREABILIDADE GÊNICA E EPIDEMIOLÓGICA DA *Escherichia coli* NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGO DE CORTE

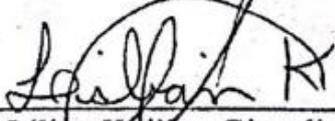
Elaborada por
Pedro Filipe de Souza Teles

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

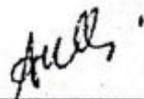
Comissão Examinadora:



Prof.ª PhD. Lenita Moura Stefani – UDESC
Universidade do Estado de Santa Catarina



Prof.ª Dra. Lillian Kolling Girardini – UNOESC
Universidade do Oeste de Santa Catarina



Dra. Adriana Mercia Guaratini Ibelli – EMBRAPA – Suínos de Aves
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Chapecó, 05 de dezembro de 2019.

“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez.”

Jean Cocteau

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e lucidez para que pudesse cursar o PPGZOO – UDESC.

Agradeço aos meus pais, Moacir Padilha Teles e Roderjania Maria de Souza, pelas condições que eles me proporcionaram para que eu chegasse até aqui.

Agradeço à minha irmã Nataly de Souza Teles por estar construindo uma carreira acadêmica, e dessa forma, me trazer muita alegria ao seguir os meus passos.

Agradeço à minha namorada Prof^ª. Dra. Andrea Noeremberg Guimarães por servir de exemplo, me apoiar e sempre me lembrar de que eu deveria concluir a parte escrita de uma vez por todas!

Agradeço imensamente a minha orientadora Prof^ª. PhD. Lenita Moura Stefani, por ter apostado em mim e ter feito tudo o que estava ao seu alcance para que eu pudesse me tornar mestre.

Agradeço a co-orientação do Prof. Dr. Marcel Manente Boiago, compartilhando comigo valiosas dicas ao longo do meu curso no programa de pós-graduação.

Agradeço aos meus antigos gestores Maria Goretti Buzanello e Cleber Maronezi, por me deixarem compensar horas para que eu pudesse frequentar as aulas.

Agradeço a equipe do LABMIM, em especial as minhas madrinhas Angélica Frigo e Luana Rampazzo, por estarem ativamente na condução desse projeto, tanto de forma operacional quanto intelectual.

Agradeço a equipe da Embrapa Suínos e Aves (em especial a Dra. Jalusa Deon Kich e Raquel Rebelatto) e ao Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária - CDPA/UFRGS (em especial ao Dr. Thales Quedi Furian) por terem realizado as técnicas laboratoriais mais aplicadas, sendo de fundamental importância para a conclusão do presente trabalho.

Agradeço à UDESC, à FAPESC e ao CNPq por investirem na geração de conhecimento e acreditarem na ciência brasileira.

Por fim, agradeço a todos os Professores e colegas que já tive em minha carreira estudantil.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

RASTREABILIDADE GÊNICA E EPIDEMIOLÓGICA DA *Escherichia coli* NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGO DE CORTE

AUTOR: Pedro Filipe de Souza Teles

ORIENTADORA: Prof. Dra. Lenita Moura Stefani

Chapecó, 01 de dezembro de 2019

A avicultura é um dos mais importantes segmentos produtivos do Brasil e sofre grandes perdas econômicas devido à bactéria *Escherichia coli*, que também é uma zoonose. De cada uma das 57 propriedades rurais produtoras de frango de corte localizadas no Oeste de Santa Catarina (Brasil) foram coletadas uma amostra de cama de aviário, uma de solo (próxima à área de biossegurança dos aviários) e uma de água (utilizada para dessedentação das aves), buscando o isolamento de *E. coli*. Da mesma forma, foram adquiridas em supermercados da região 57 amostras de carne (moela, coração, drumette ou tulipa) oriundas do frigorífico que abate as aves das propriedades rurais previamente coletadas. No total, foram coletadas 228 amostras, sendo que em 108 foi possível o isolamento de *E. coli*. Através da técnica de Eletroforese em Campo Pulsante (PFGE) investigou-se a presença de clones entre 69 isolados e através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram pesquisados em 75 isolados 12 genes de patogenicidade (adesinas) comumente encontrados em *E. coli* isolada de aves e em *E. coli* uropatogênica isolada de seres humanos (*sfa/foc*, *afa/dra*, *iha*, *hrla*, *fimC*, *fimH*, *papC*, *papG*, *tsh*, *mat*, *crl* e *felA*). Segundo a técnica de PFGE foram encontrados 10 pares de clones (dois pares água-água; três pares solo-solo e cinco pares carne-carne), sendo que desses pares, seis não foram totalmente idênticos nos genes de patogenicidade estudados, podendo indicar uma possível interferência plasmidial. Desses seis pares, cinco deles foram isolados de carne, implicando que bactérias presentes em carnes são mais susceptíveis a trocar material genético via conjugação do que aquelas presentes no meio ambiente. O fato de cada par de clone estar no mesmo substrato, sugere que determinadas cepas de *E. coli* têm preferências pelo local de desenvolvimento, tornando a transferência de um tipo de substrato para outro mais difícil de ocorrer. Entretanto, importantes genes de patogenicidade tiveram alta prevalência ao longo da cadeia produtiva de frango de corte, tais como *crl* (100%), *mat* (88%), *papG* (86,7%) e *fimC* (82,7%), indicando possíveis riscos aos seres humanos. Apesar de o presente trabalho ter sido desenvolvido apenas com a bactéria *E. coli*, ele auxilia no entendimento da dinâmica das demais enterobactérias de importância em saúde pública.

Palavras-chave: Epidemiologia, genes de patogenicidade, *pulsed field gel electrophoresis*, saúde pública

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

GENETIC AND EPIDEMIOLOGICAL TRACEABILITY OF *Escherichia coli* INSERTED IN THE PRODUCTION CHAIN OF POULTRY THROUGH MOLECULAR TECHNIQUES

AUTHOR: Pedro Filipe de Souza Teles

ADVISER: Prof. PhD. Lenita Moura Stefani

Chapecó, April 25th, 2019

Poultry farming is one of the most important productive segments in Brazil and suffers major economic losses due to the bacterium *Escherichia coli*, which is also a zoonosis. Broiler farms (n=57) located in the West of Santa Catarina (Brazil) were studied and one sample of litter, one of soil (near the biosecurity area of the aviary) and one of water (used for bird drinking) were collected for *E. coli* isolation. In addition, 57 samples of meat (gizzard, heart, drumette or tulip) were collected from supermarkets that slaughtered flocks from the previously collected farms. In total, 228 samples were collected and *E. coli* was isolated in 108. Through Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique, the presence of clones among 69 *E. coli* isolates was investigated and through the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique 75 isolates of *E. coli* were screened for 12 pathogenicity genes (adhesins) commonly found in poultry isolated *E. coli* and human isolated uropathogenic *E. coli* (*sfa/foc*, *afa/dra*, *iha*, *hrla*, *fimC*, *fimH*, *papC*, *papG*, *tsh*, *mat*, *crl* and *felA*). According to the PFGE technique, 10 pairs of clones were found (two water-water pairs; three soil-soil pairs and five meat-meat). Of these pairs, six were not completely identical in the pathogenicity genes studied, which may indicate possible plasmid interference. Of these six pairs, five were isolated from meat, implying that bacteria in meat are more likely to exchange genetic material via conjugation than those in the environment. The fact that each clone pair is on the same substrate suggests that certain strains of *E. coli* have preferences for the development site, making the transfer from one substrate type to another more difficult to occur. However, important pathogenicity genes were highly prevalent along the poultry production chain, such as *crl* (100%), *mat* (88%), *papG* (86.7%) and *fimC* (82.7%), bringing risks to humans. Although the present research was developed only with the *E. coli* bacterium, it helps to understand the dynamics of other enterobacteria of public health importance.

Keywords: Epidemiology, pathogenicity genes, public health, pulsed field gel electrophoresis

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	10
	REVISÃO DE LITERATURA.....	10
1.1	AVICULTURA.....	10
1.2	<i>Escherichia coli</i>	10
1.2.1	Genes de patogenicidade (adesinas).....	11
1.2.2	Resistência e elementos transponíveis móveis.....	12
1.3	DINÂMICA BACTERIANA E A CADEIA EPIDEMIOLÓGICA DA <i>Escherichia coli</i>	13
1.3.1	Cama de aviário.....	13
1.3.2	Recursos hídricos.....	14
1.3.3	Solo.....	14
1.3.4	Carne.....	15
1.4	OBJETIVOS.....	16
1.4.1	Objetivo geral.....	16
2	CAPÍTULO II.....	17
2.1	MANUSCRITO	17
2.1.1	Introdução.....	19
2.1.2	Materiais e métodos.....	20
2.1.3	Resultados.....	25
2.1.4	Discussão.....	33
2.1.5	Conclusão.....	38
2.1.6	Referências utilizadas no artigo.....	39
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
	REFERÊNCIAS.....	43

1. CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Avicultura

A avicultura é um dos mais importantes segmentos produtivos do Brasil. No ano de 2017 a produção nacional foi de 13,1 milhões de toneladas de carne de frango (segundo maior produtor mundial), sendo que desse montante, 4,32 milhões de toneladas foram destinadas à exportação, colocando o País como o maior exportador mundial (ABPA, 2018).

A agricultura do Estado de Santa Catarina, mais especificamente da região Oeste, é constituída em sua maioria por pequenas propriedades familiares que obtêm o seu sustento através de mais de uma atividade produtiva. Inicialmente, as principais explorações agropecuárias foram a suinocultura, avicultura, milho, feijão e soja, consolidando-se posteriormente com a bovinocultura de leite, citricultura, erva-mate, piscicultura, olericultura, fruticultura e silvicultura (FREITAS et al, 2002).

No setor da avicultura e suinocultura o sistema de integração é predominante, na qual uma empresa ou cooperativa fornece a assistência técnica e os principais insumos (pintinhos e ração) em troca da estrutura e mão-de-obra fornecida pelos produtores rurais integrados (COTTA et al., 2008).

1.2 *Escherichia coli*

A *E. coli* é o microrganismo mais estudado no mundo, e dentre as bactérias, é a que possui maior isolamento em laboratórios clínicos de microbiologia (SILVA & NEUFELD, 2006). É bastante conhecida por poder causar distúrbios intestinais (diarreia), embora a maioria das cepas não seja patogênica (SMITH, 2010).

O setor da avicultura industrial brasileira considera a *E. coli* um importante agente infeccioso e responsável por prejuízos econômicos inestimáveis, acometendo o homem e diversos animais, dentre eles: galinhas, perus, patos, gansos, pássaros domésticos e pássaros selvagens em diferentes fases da vida (CAMARGO & SUFFREDINI, 2015).

É uma bactéria gram negativa comensal do trato digestivo, podendo ou não causar doença, geralmente móvel (com flagelos peritríquios e frequentemente fimbriada) e sua classificação mais comum se dá por meio de antígenos somáticos (de constituição lipopolissacarídica), flagelares (protéica) e, às vezes, capsulares (polissacarídica), abreviados

como O, H e K, respectivamente (QUINN et al., 2005).

Das *E. coli* que causam patogenicidade e que são importantes para a medicina humana e veterinária, destacam-se os patotipos intestinais EPEC (Enteropatogênica), ETEC (Enterotoxigênica), EIEC (Enteroinvasiva), EHEC (Enterohemorrágica) e EaggEC (Enteroagregativa), além dos patotipos extra-intestinais que abrangem o grupo da ExPEC (CUNHA et al., 2013). Já no caso específico das aves, o principal patotipo é a *E. coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC) conhecida como *E. coli* Patogênica Aviária (APEC), caracterizada por causar lesões fibríneas ao redor de órgãos viscerais (KEMMET et al, 2013).

1.2.1 Genes de patogenicidade (adesinas)

Antao et al. (2009), embasados na literatura científica, comentam que as adesinas mais conhecidas presentes nas cepas de ExPEC são: *fim* (*type 1 fimbriae*), *pap* (*P fimbriae or the pilus associated with pyelonephritis*), *cgs* (*curli fiber*), *sfa* (*S fimbriae or the sialic acid-specific fimbriae*), *foc* (*F1C fimbriae*), *afa* (*afimbrial adhesins*), *dra* (*Dr fimbriae*) e *tsh* (*temperature-sensitive haemagglutinin*).

Rocha et al. (2017), afirmam que os genes *sfa/foc*, *afa/dra*, *iha*, *hrla*, *fimC*, *fimH*, *papC*, *papG*, *tsh*, *mat*, *crl* e *felA* são responsáveis pela capacidade de adesão das bactérias. Os mesmos autores analisaram 460 cepas de APEC e 450 cepas de UPEC (*Escherichia coli* uropatogênica), encontrando um grande número desses genes em ambos os patotipos. É importante ressaltar que 80% das infecções do trato urinário em seres humanos é devido à UPEC, que habita o trato digestivo juntamente com cepas comensais e têm acesso à bexiga através da uretra (MOBLEY & ALTERI, 2015).

Al-Kandari e Woodward (2018) relatam que a utilização de 40 genes de patogenicidade para classificar uma *E. coli* isolada de ave como APEC está fora da realidade da maioria dos laboratórios e que a utilização de uma menor quantidade de genes (11 no estudo deles), porém incluindo os mais comumente encontrados, pode dar uma boa noção sobre o grau de patogenicidade do isolado. Os fatores de virulência escolhidos pelos autores foram: *fimH* (*Type 1 fimbriae adhesion*), *papC* (*P-fimbriae, pyelonephritis associated pili*), *crl* (*curli fiber gene*), *tsh* (*temperature-sensitive hemagglutinin*), *cgs* (*regulator of the curli fimbriae operon*), *iucD* (*aerobactin synthesis, iron uptake chelat*), *irp2* (*iron-repressible protein associated with Yersinia bacterin synthesis*), *iss* (*increase serum survival*), *kps – K1* (*capsule polysaccharide*), *astA* (*enteroaggregative heat-stable toxin*) e *cva/vci* (*structural genes of colicin V operon*).

Cordoni et al. (2016), analisaram 272 isolados de APEC obtidos no Reino Unido, Itália e Alemanha, buscando através de PCR 15 genes de virulência. Os autores conseguiram agrupar os isolados em nove grupos distintos, com média de 6 a 8 genes de virulência por isolado, mas não encontraram associações positivas entre os filogrupos e o número ou tipo de genes.

1.2.2 Resistência e elementos transponíveis móveis

Ao longo do tempo as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência às substâncias bactericidas e/ou bacteriostáticas, adquirindo também, formas de compartilhar esses genes de resistência com outras bactérias. A conjugação bacteriana é um mecanismo de transferência de material genético (DNA), no qual através de plasmídeos conjugativos, ocorre a transferência de genes entre a maioria das bactérias, tornando-se um dos principais agentes causadores da disseminação de resistência a antibióticos entre bactérias patogênicas (LLOSA et al., 2002).

Os plasmídeos são moléculas de DNA encontradas no citoplasma das células bacterianas, que apesar de serem herdadas por ambas as células filhas durante a divisão celular, possuem a capacidade de se multiplicarem independentemente do cromossomo (SUMMERS, 1996). Geralmente quando presentes na bactéria, os genes de resistência e de patogenicidade são transportados pelos plasmídeos (SMITH, 2010). Muitos desses são transmitidos entre bactérias através de uma organela chamada pili conjugativa, porém o custo para a bactéria expressar o gene e desenvolver a organela é bastante alto, podendo perder o seu potencial de virulência (HAFT et al., 2009).

No grupo dos elementos transponíveis móveis passíveis de alterar o material genético das bactérias, ainda há os transposons e íntegrans. Os transposons, também chamados de “genes saltadores”, têm a habilidade de se moverem no genoma bacteriano ou tornarem-se integrados ao DNA plasmidial (QUINN et al., 2005). São elementos transponíveis móveis que sem qualquer requisito de homologia, podem translocar de um sítio doador para um dos muitos sítios de destino (HAYES, 2003). Já os íntegrans, fazem o reconhecimento de sítios específicos de recombinação de um gene cassete e através de uma integrase própria, conseguem realizar a excisão e a inserção de genes (QUINN et al., 2005).

1.3 Dinâmica bacteriana e a cadeia epidemiológica da *Escherichia coli*

Para saber quais os riscos de uma bactéria localizada ao longo da cadeia produtiva de alimentos (origem animal) causar problemas à saúde pública, é necessário entender de que forma acontece a dinâmica bacteriana. Rwego et al. (2008), confirma dizendo que só teremos intervenções racionais para salvar humanos e animais quando, de fato, entendermos os fatores ecológicos e comportamentais que influenciam a transmissão de patógenos entre as espécies.

A *E. coli* é uma bactéria comensal presente no trato intestinal de animais de sangue quente, porém, é capaz de sobreviver fora de um hospedeiro e persistir por longos períodos no meio ambiente, como em cursos d'água, solo, areia e sedimentos (ISHII & SADOWSKI, 2008).

A bactéria pode circular no sistema de produção (aviário e seus arredores), dependendo dos cuidados que o produtor rural irá adotar no manejo dos animais e dejetos (TELES, 2018). Existe também a possibilidade dessas bactérias chegarem ao mercado consumidor através das carcaças comercializadas de forma *in natura* (OLIVEIRA et al., 2011).

1.3.1 Cama de aviário

No sistema de produção de frango de corte utiliza-se o reaproveitamento da cama do aviário em até 12 lotes consecutivos, o que representa aproximadamente dois anos sem a lavagem do aviário e a troca completa da cama por maravalha nova (BRF, 2014). A cama de aviário consiste em uma mistura de material vegetal para forrar o piso do galpão (geralmente maravalha), restos de ração, descamações de pele, penas e excrementos das aves (DE PAULA JUNIOR, 2014).

Estima-se que em um grama de excretas pode haver cerca de 10^6 UFC de *E. coli*, e dessas, 15% poderiam ser patogênicas para um pintinho de 1 dia, que vai adquirindo resistência contra essa bactéria a medida que cresce (BORATTO et al., 2004). Sendo assim, o aviário passa a ser um importante reservatório da bactéria, por proporcionar calor, umidade, nutrientes e um número considerável de hospedeiros (as aves).

1.3.2 Recursos hídricos

O fornecimento de água para as pequenas propriedades rurais do Oeste de Santa Catarina geralmente é através de poço artesiano, fonte protegida, nascente e cisterna, sendo que nem todas podem ser potáveis para os animais e seres humanos (TELES, 2018). A ocupação da região foi realizada de maneira não sustentável, o que trouxe inúmeros problemas, tais como: o alto grau de desmatamento, a erosão do solo, o assoreamento dos cursos d' água, o uso intenso e não planejado de dejetos suínos, a utilização de agrotóxicos, a falta de tratamento de esgoto nas cidades, a disposição inadequada do lixo e efluentes industriais (FREITAS et al., 2002).

A má qualidade da água é agravada pela falta de higiene dos reservatórios, que no caso da avicultura, torna-se ainda mais importante, pois a água é disponibilizada em linhas de *nipple*, considerado um sistema fechado e que necessita de tratamento (AMARAL et al., 2001).

Geralmente o produtor rural faz o tratamento da água destinada à dessedentação dos animais conforme as orientações técnicas dos extensionistas (profissionais que levam tecnologia ao produtor rural), porém, a água utilizada na sua residência pode ser da mesma origem e não receber nenhum tratamento (TELES, 2018). Um trabalho conduzido em 2003 constatou que apenas 3,3% de 30 propriedades rurais visitadas realizavam tratamento da água e limpeza periódica dos reservatórios que forneciam água para as casas dos produtores rurais (AMARAL et al., 2003). Este passa a ser um indicador alarmante quando se leva em consideração que o ser humano também pode ser um importante agente na cadeia epidemiológica da *E. coli* (CUNHA et al., 2013).

A situação do saneamento básico do meio urbano também deve ser acompanhada. A utilização de águas residuárias advindas de cidades na agricultura pode transmitir contaminantes para o solo, como bactérias coliformes fecais e outros patógenos (SOUZA et al., 2011). Dessa forma, pode ocorrer o retorno de microrganismos do meio urbano para o meio rural.

1.3.3 Solo

Como em qualquer outra atividade produtiva, a avicultura gera resíduos que não podem ser devolvidos ao meio ambiente sem o devido tratamento prévio (DE PAULA JUNIOR, 2014). Segundo Cotta et al. (2008) é importante sempre iniciar as atividades pelos

locais mais limpos seguindo para os mais sujos, e principalmente, deve-se higienizar as ferramentas, implementos agrícolas e máquinas antes de serem utilizadas.

O adubo oriundo de cama de aviário é muitas vezes utilizado em lavouras ou em hortas comerciais (TELES, 2019). Não é rara a ocorrência de surtos provocados por *E. coli* O157:H7 veiculada por frutas e vegetais envolvidos em contaminação cruzada, o que deixa clara a necessidade de monitoramento em diferentes produtos e regiões, principalmente dos consumidos *in natura* (SILVA et al., 2003).

1.3.4 Carne

A carne de frango é considerada um alimento saudável, sem restrição de consumo por faixa etária, porém, *in natura* possui propriedades que servem como um excelente substrato para microrganismos, tais como a *E. coli* (SOUZA, 2016). Por isso, é muito importante manter o produto adequadamente conservado (refrigerado ou congelado) logo após o processamento das carcaças ou cortes, no intuito de conter a proliferação bacteriana (OLIVEIRA et al., 2011).

Algumas cepas de *E. coli* encontradas em aves possuem caráter zoonótico, sendo comprovado experimentalmente que podem causar infecções em mamíferos, assim como, existem estirpes humanas que também podem causar infecções em aves (CUNHA et al., 2013). Manges e Johnson (2012) comentam que isolados de *E. coli* em frangos possuem genes de virulência similares aos da ExPEC (*E. coli Extra-intestinal Pathogenic*) humana e que com base em evidências da comunidade científica, carne de origem aviária é a fonte de alimento mais intimamente ligada à ela. Ferreira et al. (2018), ao avaliarem alguns estudos epidemiológicos, comentam que nos casos em que há alta contaminação de carcaças de frangos, há grandes chances das cepas de *E. coli* atuarem como fonte de ExPEC.

No ano de 1983 o sorotipo *E. coli* O157:H7 do grupo das enterohemorrágicas (EHEC) ficou muito conhecido por um surto ocorrido nos Estados Unidos devido à ingestão de hambúrgueres malcozidos (MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006). Sendo assim, a preocupação com a presença de *E. coli* em carnes vai além de sua contribuição com a resistência aos antimicrobianos, abrangendo outros assuntos de saúde pública, tais como as intoxicações alimentares (OLIVEIRA et al., 2011).

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

O presente estudo visou analisar parte da cadeia epidemiológica da bactéria *E. coli* através da correlação gênica de cepas localizadas no meio rural (presentes em água, solo e cama de aviário) e no produto final embalado (carne de aves). Além disso, identificaram-se os principais genes de patogenicidade (adesinas) que podem estar presentes ao longo da cadeia produtiva de frango de corte.

2 CAPÍTULO II

2.1 MANUSCRITO

Rastreabilidade gênica e epidemiológica da *Escherichia coli* na cadeia produtiva de frango de corte

Pedro Filipe de Souza Teles^a, Lenita Moura Stefani^b, Marcel Manente Boiago^a, Angélica Frigo^a, Luana Rampazzo^a, Denise Araújo Nunes^a, Jalusa Deon Kich^c, Raquel Rebelatto^c, Thales Quedi Furian^d

^aUniversidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó-SC, Brasil

^bUniversidade do Estado de Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brasil

^cEmpresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Concórdia-SC, Brasil

^dUniversidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil

De acordo com normas para publicação em:

British Poultry Science

Rastreabilidade gênica e epidemiológica da *Escherichia coli* inserida na cadeia produtiva de frango de corte

Pedro Filipe de Souza Teles^a, Lenita Moura Stefani^b, Marcel Manente Boiago^a, Angélica Frigo^a, Luana Rampazzo^a, Denise Araújo Nunes^a, Jalusa Deon Kich^c, Raquel Rebelatto^c, Thales Quedi Furian^d

^aUniversidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, Brasil

^bUniversidade do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

^cEmpresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Concórdia, Brasil

^dUniversidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil

RESUMO – A avicultura é um dos mais importantes segmentos produtivos do Brasil e sofre grandes perdas econômicas devido à bactéria *Escherichia coli*, que também é uma zoonose. De cada uma das 57 propriedades rurais produtoras de frango de corte localizadas no Oeste de Santa Catarina (Brasil) foram coletadas uma amostra de cama de aviário, uma de solo (próxima à área de biossegurança dos aviários) e uma de água (utilizada para dessedentação das aves), buscando o isolamento de *E. coli*. Da mesma forma, foram adquiridas em supermercados da região 57 amostras de carne (moela, coração, drumette ou tulipa) oriundas do frigorífico que abate as aves das propriedades rurais previamente coletadas. No total, foram coletadas 228 amostras, sendo que em 108 foi possível o isolamento de *E. coli*. Através da técnica de Eletroforese em Campo Pulsante (PFGE) investigou-se a presença de clones entre 69 isolados e através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram pesquisados em 75 isolados 12 genes de patogenicidade (adesinas) comumente encontrados em *E. coli* isolada de aves e em *E. coli* uropatogênica isolada de seres humanos (*sfa/foc*, *afa/dra*, *iha*, *hrla*, *fimC*, *fimH*, *papC*, *papG*, *tsh*, *mat*, *crl* e *felA*). Segundo a técnica de PFGE foram encontrados 10 pares de clones (dois pares água-água; três pares solo-solo e cinco pares carne-carne), sendo que desses pares, seis não foram totalmente idênticos nos genes de patogenicidade estudados, podendo indicar uma possível interferência plasmidial. Desses seis pares, cinco deles foram isolados de carne, implicando que bactérias presentes em carnes são mais susceptíveis a trocar material genético via conjugação do que aquelas presentes no meio ambiente. O fato de cada par de clone estar no mesmo substrato, sugere que determinadas cepas de *E. coli* têm preferências pelo local de desenvolvimento, tornando a transferência de um tipo de substrato para outro mais difícil de ocorrer. Entretanto, importantes genes de patogenicidade tiveram alta prevalência ao longo da cadeia produtiva de frango de corte, tais como *crl* (100%), *mat* (88%), *papG* (86,7%) e *fimC* (82,7%), indicando possíveis riscos aos seres humanos. Apesar de o presente trabalho ter sido desenvolvido apenas com a bactéria *E. coli*, ele auxilia no entendimento da dinâmica das demais enterobactérias de importância em saúde pública.

Palavras-chave: Epidemiologia, genes de patogenicidade, *pulsed field gel electrophoresis*,

saúde pública

ABSTRACT - Poultry farming is one of the most important productive segments in Brazil and suffers major economic losses due to the bacterium *Escherichia coli*, which is also a zoonosis. Broiler farms (n=57) located in the West of Santa Catarina (Brazil) were studied and one sample of litter, one of soil (near the biosecurity area of the aviary) and one of water (used for bird drinking) were collected for *E. coli* isolation. In addition, 57 samples of meat (gizzard, heart, drumette or tulip) were collected from supermarkets that slaughtered flocks from the previously collected farms. In total, 228 samples were collected and *E. coli* was isolated in 108. Through Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique, the presence of clones among 69 *E. coli* isolates was investigated and through the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique 75 isolates of *E. coli* were screened for 12 pathogenicity genes (adhesins) commonly found in poultry isolated *E. coli* and human isolated uropathogenic *E. coli* (*sfa/foc*, *afa/dra*, *iha*, *hrla*, *fimC*, *fimH*, *papC*, *papG*, *tsh*, *mat*, *crl* and *felA*). According to the PFGE technique, 10 pairs of clones were found (two water-water pairs; three soil-soil pairs and five meat-meat). Of these pairs, six were not completely identical in the pathogenicity genes studied, which may indicate possible plasmid interference. Of these six pairs, five were isolated from meat, implying that bacteria in meat are more likely to exchange genetic material via conjugation than those in the environment. The fact that each clone pair is on the same substrate suggests that certain strains of *E. coli* have preferences for the development site, making the transfer from one substrate type to another more difficult to occur. However, important pathogenicity genes were highly prevalent along the poultry production chain, such as *crl* (100%), *mat* (88%), *papG* (86.7%) and *fimC* (82.7%), bringing risks to humans. Although the present research was developed only with the *E. coli* bacterium, it helps to understand the dynamics of other enterobacteria of public health importance.

Keywords: Epidemiology, pathogenicity genes, public health, pulsed field gel electrophoresis

2.1.1 Introdução

A *Escherichia coli* é responsável por prejuízos econômicos inestimáveis em animais de produção e representa um risco para a saúde dos seres humanos (CAMARGO & SUFFREDINI, 2015). Para a obtenção de respostas efetivas em como se portar frente aos novos desafios da saúde pública, as pesquisas precisam utilizar tecnologias inovadoras, principalmente aquelas que envolvam análises genéticas. Reeves et al. (2011) confirmam dizendo que nos últimos anos a taxonomia é baseada principalmente em dados de sequência genética e que o completo sequenciamento gênico permitiu um grande avanço na compreensão de pesquisadores em relação à diversidade bacteriana.

Rwego et al. (2008) afirmaram que só teremos intervenções racionais para salvaguardar humanos e animais quando, de fato, entendermos os fatores ecológicos e comportamentais que influenciam a transmissão de patógenos entre as espécies.

Uma das técnicas de biologia molecular considerada padrão ouro para pesquisas epidemiológicas é a eletroforese em campo pulsante ou “*pulsed field gel eletrophoresis - PFGE*”, em que utilizando uma enzima de restrição, 100% do material genético é avaliado (MAGALHÃES et al., 2005).

Sendo assim, o presente estudo fez uma rastreabilidade gênica e epidemiológica da bactéria *E. coli* na cadeia produtiva de frango de corte, utilizando a técnica de PFGE para delinear uma correlação entre as cepas localizadas no meio rural (água, solo e cama de aviário) e no produto final embalado (carne de aves), além de identificar a presença de alguns dos principais genes de patogenicidade (adesinas) através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A partir disso, buscou-se também uma melhor compreensão da dinâmica de outras enterobactérias de interesse em saúde pública.

2.1.2 Material e métodos

2.1.2.1 Coleta de amostras ambientais e isolamento bacteriano

Foram coletadas entre os dias 26/03/2018 e 01/05/2018, 171 amostras provenientes de 57 propriedades rurais com atividades avícolas (frango de corte) localizadas na região de Chapecó (SC), integradas a uma mesma empresa e sob o mesmo regime de criação das aves. Em cada propriedade foi coletada uma amostra de cama de aviário, uma amostra de água (podendo ser de poço artesiano, fonte protegida, nascente ou cisterna) e uma amostra de solo.

As amostras de solo foram coletadas próximas da área de biossegurança em um *pool* de três locais distintos (cinco cm de profundidade) com o auxílio de uma colher esterilizada em fogo e acondicionadas em saco plástico esterilizado. Já as amostras de cama de aviário foram coletadas em um *pool* de três locais dentro do aviário contendo excretas frescas e cama antiga, utilizado-se para coleta a própria embalagem (saco plástico esterilizado) enviada ao laboratório. Para as amostras de água, foram utilizados frascos estéreis e a coleta foi realizada diretamente no local de armazenamento (ex.: fonte protegida) ou após três segundos de água corrente (em caso de haver encanamento). As amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno (solo e cama de aviário) e frascos (água) esterilizados, sendo transportadas sob refrigeração até o laboratório.

As análises foram feitas no Laboratório de Biologia Molecular, Imunologia e Microbiologia (LABMIM) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), no Centro de Educação Superior do Oeste (CEO), em Chapecó - SC.

O isolamento de *E. coli* foi realizado de acordo com a descrição de Quinn et al. (2005) com algumas adaptações para a rotina do LABMIM, em que as amostras foram incubadas em caldo lactosado na proporção 9:1 (nove partes de caldo lactosado para uma parte de amostra) e incubadas por 24 horas na temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Em seguida, foram semeadas em placas de petri contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB LEVINE – KASVI-K25-610019) e incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Quando presentes, uma colônia verde metálica de cada amostra foi inoculada individualmente em microtubos contendo Tryptone Soya Ágar (TSA), sendo incubados a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Posteriormente foi adicionada glicerina e os microtubos foram armazenados na bacterioteca em triplicata à -20°C para testes posteriores.

2.1.2.2 Levantamento epidemiológico

Durante as visitas de coleta de amostras ambientais, foi realizado um questionário com o produtor rural solicitando as seguintes informações: nome do produtor rural, localização (município e linha rural), idade das aves, número de lotes feitos na cama do aviário, ocorrência de antibioticoterapia (se houve, foi especificado qual a medicação, período realizado e tempo de carência), atividades agropecuárias realizadas na granja, atividades agropecuárias realizadas na vizinhança, origem da amostra de água e o histórico do local onde foi coletada a amostra de solo (se houve adubação, qual o tipo de adubação e se houve trânsito de animais).

As informações compiladas foram utilizadas para auxiliar na compreensão dos resultados de positividade e correlação gênica obtidas nas amostras.

2.1.2.3 Coleta de amostras em supermercado e isolamento bacteriano

Nos meses de maio e junho de 2018 foram coletadas 57 amostras, entre moela, coração, coxinha da asa (drumette) e meio da asa (tulipa) de frango, comercializadas *in natura* congeladas, já embaladas de fábrica e adquiridas em redes de supermercados da cidade de Chapecó – SC.

Não foi possível padronizar um número fixo de coletas para cada tipo de carne devido à dificuldade de encontrar lotes de carne disponíveis no mercado que fossem relacionados com o frigorífico que realizava o abate das aves das granjas pesquisadas. A necessidade de se

obter os resultados no menor tempo possível para que fosse possível estudar um fluxograma mais próximo da realidade, fez com que o período de coletas fosse reduzido (dois meses).

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, Imunologia e Microbiologia (LABMIM) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), no Centro de Educação Superior do Oeste (CEO), em Chapecó - SC.

O procedimento para isolamento de possíveis cepas de *E. coli* nas amostras de cortes de carne de frango seguiu o protocolo de Downes & Ito (2001), com adaptações para a rotina do LABMIM.

Os produtos cárneos foram descongelados a temperatura ambiente e posteriormente, 25g de cada amostra foram colocadas de forma asséptica em sacos de polietileno esterilizados. Então, adicionaram-se 225 mL de água peptona a 1% esterilizada, homogeneizando-se durante um minuto e seguido de incubação a 37 ± 1 °C por 24 horas. O restante do procedimento assemelha-se ao item 2.1.2.1.

2.1.2.4 Eletroforese em campo pulsante

A eletroforese em campo pulsante ou “*pulsed field gel eletrophoresis* - PFGE” utiliza uma enzima de restrição que digere o DNA bacteriano e cliva o cromossomo em grandes fragmentos que são visualizados posteriormente através de eletroforese (MAGALHÃES et al., 2005).

Para a técnica de PFGE foram utilizados todos os isolados de *E. coli* oriundos de água, carne e solo. Já para as amostras de cama de aviário, em virtude do alto custo da técnica, foram selecionadas apenas as amostras das granjas que também tiveram positividade em água e/ou solo e/ou amostra(s) de carne(s) de lotes com data de abate relacionada com abates da granja em questão.

A técnica foi realizada segundo Ribot et al. (2006) com pequenas adaptações feitas pelo Laboratório de Sanidade e Genética Animal (LSGA) da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia-SC), respeitando o que está descrito no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, GA). Foi utilizado o “*One-Day (24–28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of E. coli O157:H7, non-typhoidal Salmonella serotypes, and Shigella sonnei by pulsed field gel electrophoresis* (PFGE)” (CDC, 2004 <http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols.htm>). A suspensão bacteriana foi embebida em agarose, lisada, lavada e digerida com a enzima de restrição *XbaI* (*New England Biolabs*, Beverly, MA) entre 12 e 16 horas a 37°C (“overnight”). A eletroforese foi realizada em gel de

agarose a 1% usando tampão Tris-borato-EDTA 0,5X em um Chef Mapper XA (*BioRad Laboratories*, Hercules, CA) a 6 V/cm por 19h à 14° C com um tempo de troca inicial de 2min e 16s e um tempo final de troca de 63,8s. Os géis foram corados durante 30 min a temperatura ambiente com brometo de etídio (*Invitrogen*, Carlsbad, CA), descorados e fotografados. Foi utilizada como referência uma cepa de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serovar Braenderup (ATCC®BAA-664). As imagens padrão foram adquiridas utilizando um sistema Kodak Gel Logic 2200 e analisadas usando o programa BioNumerics, versão 2.0 (*Applied Maths BVBA*, Saint-Martens-Latem-Belgium).

2.1.2.5 Análise dos dados

Através de um coeficiente de correlação dos dados, foi possível determinar a similaridade entre os perfis obtidos no gel. De acordo com a técnica de Carriço et al. (2005), para a análise dos padrões de PFGE utiliza-se uma tolerância de posição (divergência) de banda de até 1,7%. Segundo Magalhães et al. (2005), aquelas que tiverem alterações envolvendo de 4 a 6 bandas podem ter sofrido eventos genéticos como a inserção, deleção e/ou mutação de genes, sendo nesses casos, consideradas cepas relacionadas.

Os dendrogramas foram gerados por agrupamento de pares não ponderados com média matemática (*Unweighted Pairwise Grouping with Mathematical Averaging - UPGMA*). No caso de o número e a localização das bandas serem indistinguíveis, foram considerados os isolados como pertencentes ao mesmo pulsotipo.

2.1.2.6 Pesquisa dos genes de adesinas

Todas as cepas utilizadas para a realização da PFGE foram enviadas ao Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde realizou-se a pesquisa dos principais genes de adesinas (Tabela 1).

Tabela 1 – Primers dos genes relacionados às adesinas, pares de bases (pb) e referências.

Gene	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Amplicon (pb)	Referências
<i>sfa/foc</i>	GTCCTGACTCATCTGAAACTGCA	1242	Ewers et al. (2007)
	CGGAGAAGTGGGTGCATCTTA		
<i>afa/draB</i>	TAAGGAAGTGAAGGAGCGTG	810	Ewers et al. (2007)
	CCAGTAACTGTCCGTGACA		
<i>Iha</i>	TAGTGC GTTGGGTATCGCTC	608	Ewers et al. (2007)
	AAGCCAGAGTGGTTATTCGC		
<i>hrla</i>	TCACTTGCAGACCAGCGTTTC	540	Ewers et al. (2007)
	GTAAC TCACTGCTGT CACCT		
<i>fimC</i>	GGGTAGAAAATGCCGATGGTG	496	Janssen et al. (2001)
	CGTCATTTTGGGGTAAGTGC		
<i>tsh</i>	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	824	Ewers et al. (2007)
	CTCCGATGTTCTGAACGT		
<i>papC</i>	TGATATCACGCAGTCAGTAGC	508	Janssen et al. (2001)
	CCGGCCATATTCACATAAC		
<i>mat</i>	TATACGCTGGACTGAGTCGTG	900	Ewers et al. (2007)
	CAGGTAGCGTCGAACTGTA		
<i>crl</i>	TTTCGATTGTCTGGCTGTATG	270	Maurer et al. (1998)
	CTTCAGATTCAGCGTCGTC		
<i>feA</i>	GGCAGTGGTGTCTTTTGGTG	270	Johnson & Stell (2000)
	GGCCCAGTAAAAGATAATTGAACC		
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	1070	Johnson & Stell (2000)
	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA		
<i>papG</i>	CTGTAATTACGGAAGTGATTCTG	508	Johnson & Stell (2000)
	ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT		

A extração do DNA para a execução dos testes moleculares foi realizada através do método por calor, adaptada a partir da técnica descrita por Borsoi et al. (2009). Uma alíquota de 50 µL de cada uma das amostras armazenadas em BHI com glicerol foi reativada em caldo BHI, o qual foi incubado a 37 ± 1 °C por 24 horas em estufa bacteriológica. Posteriormente, o caldo cultivado foi semeado por esgotamento em ágar EMB. As placas foram novamente incubadas conforme as condições anteriormente descritas. Foram coletadas entre três a cinco colônias bacterianas isoladas no ágar EMB com uma alça de platina estéril e solubilizadas em um microtubo contendo 200 µL de água ultrapura. Após, a solução foi resfriada a -20°C por 10 minutos e em seguida, aquecida a 100°C pelo mesmo período em banho-maria com agitação. Por último, a solução foi centrifugada a 14.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante

contendo o DNA foi repassado para um novo microtubo. O material foi armazenado a -20°C até o momento da análise.

A reação de PCR convencional foi feita a partir do uso de Taq polimerase 0,4 μL , tampão 10X 2,5 μL , dnTPs (10 mM) 0,5 μL , primers na concentração de 100 pmol 0,1 μL , MgCl (4 mM) 2 μL , 5 μL do DNA da amostra e água qsp (quantidade suficiente para completar o volume final).

2.1.3 Resultados

Na Tabela 2 pode-se observar a positividade absoluta e relativa para cada substrato. Das 228 amostras coletadas (57 de cada substrato), foi possível fazer o isolamento de 108 cepas de *E. coli* (47,4% do total), sendo 16 provenientes de amostras de água (14,8%), 53 de amostras de cama de aviário (49,1%), 15 de amostras de solo (13,9%) e 24 de amostras de carne (22,2%).

Tabela 2 – Positividade de *Escherichia coli* absoluta e relativa (individual para cada substrato amostrado).

	Total	Positividade absoluta	Positividade relativa (%)
Água	57	16	28,1
Cama de aviário	57	53	93,0
Solo	57	15	26,3
Carne	57	24	42,1%

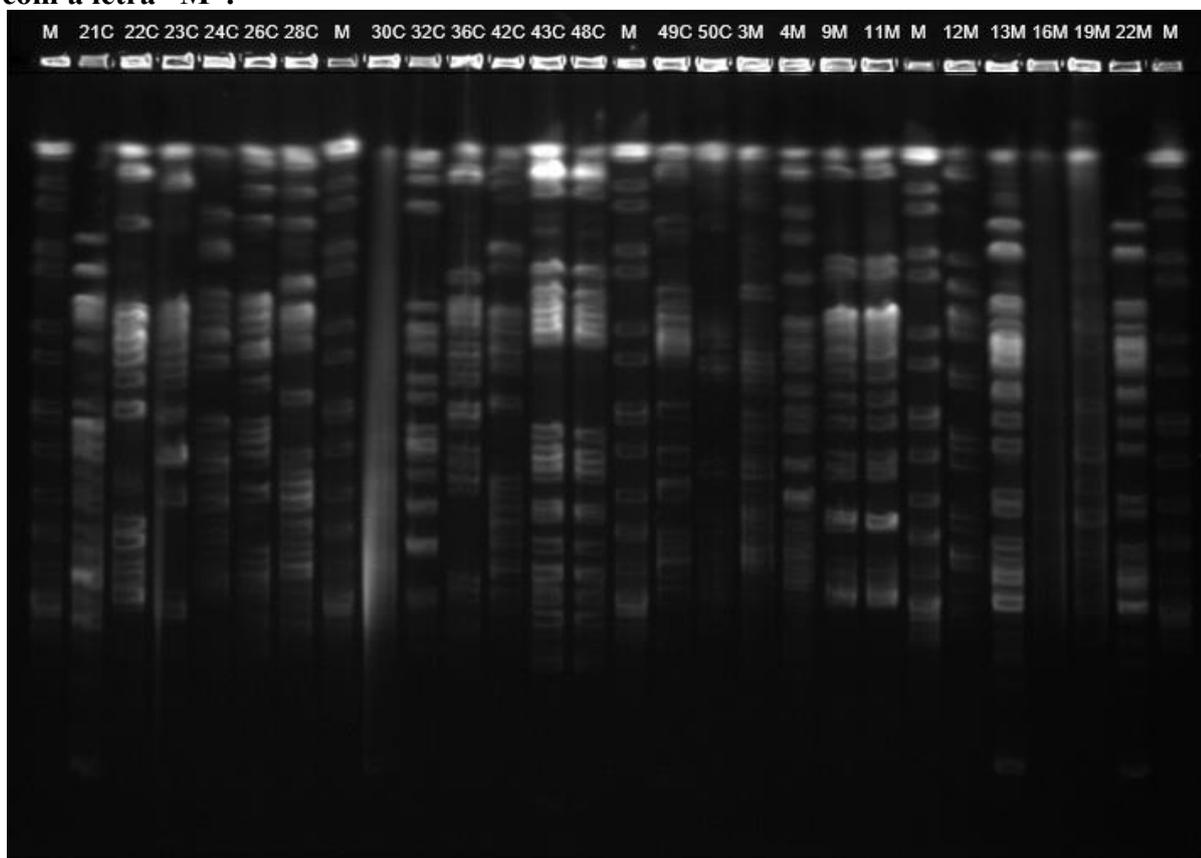
Uma cepa isolada de solo (9S) e seis de carne (2M, 18M, 26M, 27M, 35M e 37M) foram descartadas pelo Laboratório de Sanidade e Genética Animal (LSGA) da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia-SC) devido à contaminação das mesmas por outra espécie bacteriana. Sendo assim, para a técnica de PFGE foram testadas 69 cepas de *E. coli*, totalizando 16 em amostras de água, 14 em amostras de solo, 21 em amostras de cama de aviário e 18 em amostras de carne conforme o Quadro 1.

Quadro 1 – Cepas isoladas de *Escherichia coli* (de acordo com cada substrato) utilizadas para a realização do PFGE, sendo que numerações iguais para solo, água e cama de aviário referem-se à mesma granja.

Amostras de água											
10A	14A	18A	22A	23A	24A	26A	27A	28A	35A	36A	39A
47A	49A	51A	52A								
Amostras de solo											
3S	4S	5S	22S	23S	25S	26S	28S	29S	30S	32S	36S
49S	53S										
Amostras de cama de aviário											
3C	6C	8C	9C	11C	12C	13C	21C	22C	23C	24C	26C
28C	30C	32C	36C	42C	43C	48C	49C	50C			
Amostras de carne											
3M	4M	9M	11M	12M	13M	16M	19M	22M	24M	29M	34M
44M	45M	48M	50M	51M	57M						

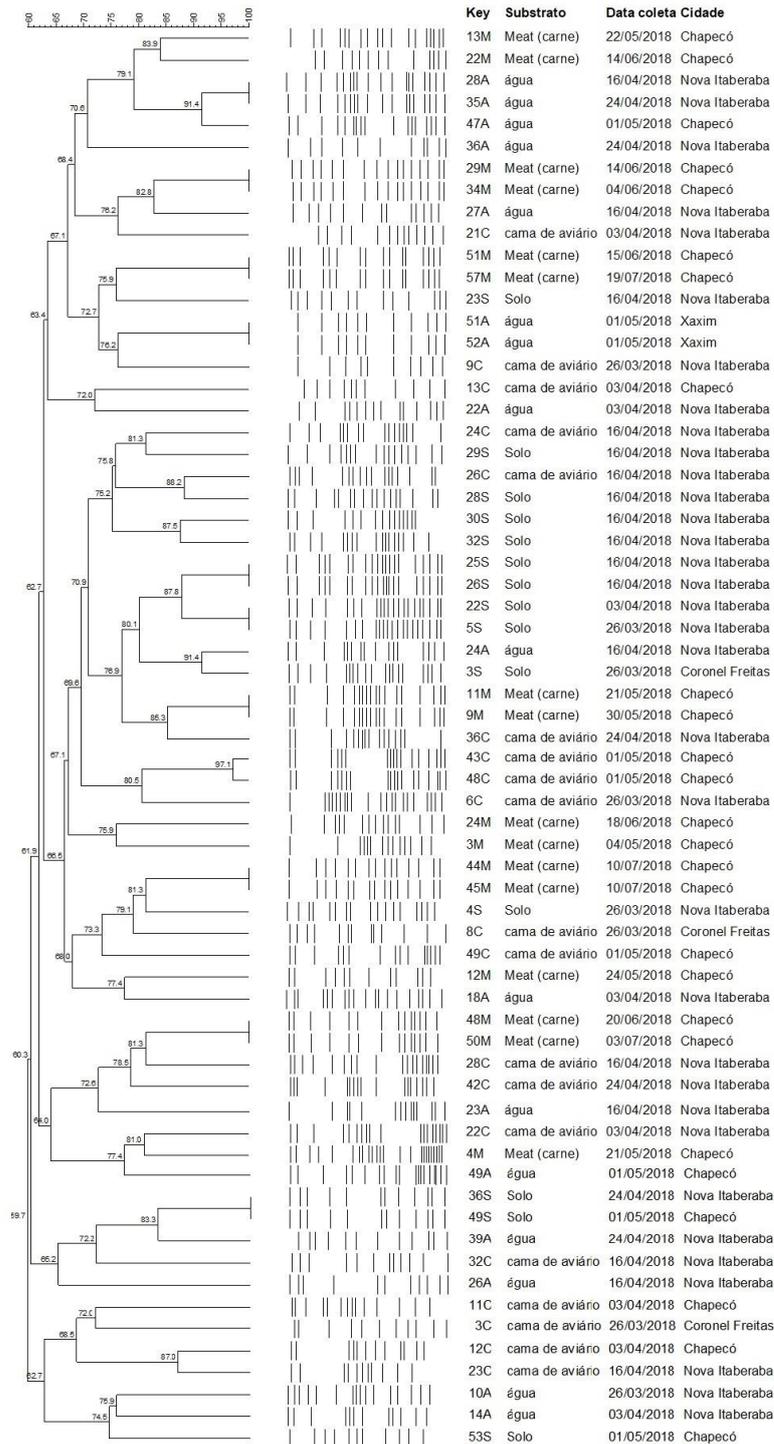
Das 69 amostras avaliadas no PFGE, duas amostras de cama de aviário (30C e 50C) e duas amostras de carne (16M e 19M) não foram possíveis tipificar através do PFGE (Figura 1) por não resultarem perfis de banda definidos.

Figura 1 - Perfil de restrição de 23 isolados de *Escherichia coli* gerado após digestão com enzima *Xba*I e eletroforese em campo pulsado. As bandas controle estão identificadas com a letra “M”.



O dendrograma (Figura 2) foi elaborado com as 65 amostras que possuíam claramente o perfil *E. coli* no PFGE demonstrando 10 pares de clones, sendo que cada par pertencia ao mesmo substrato. Na Tabela 3 está especificado particularidades de cada par de clones encontrado.

Figura 2 - Dendrograma representativo de 65 isolados de *Escherichia coli* após a análise por PFGE com a enzima *Xba*I.



Das cepas isoladas de cama de aviário não foi encontrado nenhum par de clone. As que mais se aproximaram foram as amostras 43C (Latitude: 27°13'17"; Longitude: 52°43'26"; lote com 36 dias; oitavo lote alojado consecutivamente sem remoção total da cama; coleta: 01/05/2018) e 48C (Latitude: 27°07'47"; Longitude: 52°35'08"; lote com 17 dias; terceiro lote alojado consecutivamente sem remoção total da cama; coleta: 01/05/2018) com 97,1% de similaridade e aproximadamente 17,1 km de distância entre elas.

Tabela 3 – Informações extras sobre o perfil de cada par de cepas isoladas de *Escherichia coli* identificadas como clones.

Par de clones	Amostra	Características
1	28A	Coordenadas (Latitude: 26°58'20"; Longitude: 52°49'31"); água de cisterna; coleta: 16/04/2018.
	35A	Coordenadas (Latitude: 26°59'21"; Longitude: 52°47'33"); água de fonte protegida; coleta: 24/04/2018.
	Distância entre os dois pontos: 3756,310 m (3,7 km)	
2	51A	Coordenadas (Latitude: 27°01'23"; Longitude: 52°32'01"); água de fonte; coleta: 01/05/2018.
	52A	Coordenadas (Latitude: 27°03'38"; Longitude: 52°32'46"); água de fonte; coleta: 01/05/2018.
	Distância entre os dois pontos: 4336,196 m (4,3 km)	
3	5S	Coordenadas (Latitude: 26°55'06"; Longitude: 52°50'23"); plantação de mandioca adubada com silagem descarte; coleta: 26/03/2018.
	22S	Coordenadas (Latitude: 26°56'07"; Longitude: 52°49'01"); pomar adubado com cama de aviário há 1 ano e chorume há 6 meses; com trânsito de animais; coleta: 03/04/2018.
	Distância entre os dois pontos: 2939,615 m (2,9 km)	
4	25S	Coordenadas (Latitude: 26°59'44"; Longitude: 52°53'25"); milho adubado com cama de aviário há aproximadamente 6 meses; coleta: 16/04/2018
	26S	Coordenadas (Latitude: 26°59'47"; Longitude: 52°52'34"); pomar adubado com silagem descarte, serragem e cama de aviário; coleta: 16/04/2018.
	Distância entre os dois pontos: 1409,184 m (1,4 km)	
5	36S	Coordenadas (Latitude: 26°59'04"; Longitude: 52°47'45"); horta adubada com cama de aviário há um mês; coleta: 24/04/2018.
	49S	Coordenadas (Latitude: 27°38'57"; Longitude: 52°21'13"); canteiro de flores não adubado; coleta: 01/05/2018.
	Distância entre os dois pontos: 85547,050 m (85,5 km)	
6	9M	Tulipa; lote abatido em 21/05/2018.
	11M	Drumette; lote abatido em 30/05/2018.
7	29M	Moela; lote abatido em 16/04/2018.
	34M	Drumette; lote abatido em 04/06/2018.
8	44M	Drumette; lote abatido em 10/07/2018.
	45M	Tulipa; lote abatido em 10/07/2018.
9	48M	Coração; lote abatido em 20/06/2018.
	50M	Tulipa; lote abatido em 03/07/2018.
10	51M	Moela; lote abatido em 15/06/2018.
	57M	Drumette; lote abatido em 19/07/2018.

Nenhum clone foi encontrado na mesma propriedade, sendo que dos isolados, a maior correlação foi de 70,9% em duas situações: uma entre as amostras de água e solo da

propriedade 24 e a outra entre as amostras de cama de aviário e solo da propriedade número 26 (Quadro 2).

Quadro 2 – Correlação entre os isolados de água, cama de aviário e solo da mesma propriedade.

Isolados		Correlação (%)	Isolados		Correlação (%)
3C	3S	60,3	28C	28S	62,7
22C	22S	61,9	28C	28A	62,7
22C	22A	62,7	28S	28A	63,4
22S	22A	63,4	32C	32S	61,9
23C	23S	60,3	36C	36S	61,9
23C	23A	60,3	36C	36A	63,4
23S	23A	62,7	36S	36A	61,9
24C	24A	70,9	49C	49S	61,9
26C	26S	70,9	49C	49A	62,7
26C	26A	61,9	49S	49A	61,9
26S	26A	61,9			

As amostras de carne continham cortes (drumette e tulipa) e miúdos (coração e moela), sendo possível isolar 24 cepas de *E. coli* das 57 amostras coletadas (42,1%). Na Tabela 4 está especificado o número de amostras de cada tipo de carne e a sua positividade.

Tabela 4 – Positividade para *Escherichia coli* das amostras de carne coletadas.

	Carnes	Moela	Coração	Tulipa	Drumette
Total	57	17	15	8	17
Positividade	24	4	3	6	11
(%)	42,1%	23,5%	20%	75%	64,7%

O Quadro 3 traz particularidades de cada amostra de carne e as possíveis relações com os isolados das 57 granjas. Para tal, utilizaram-se as últimas datas de abate de cada granja comparadas com a data de embalo dos cortes e miúdos.

Quadro 3 – Característica das amostras de carne que apresentaram positividade para *Escherichia coli* e a sua possível relação com os demais isolados.

Amostra	Tipo de carne	Amostras possivelmente relacionadas
2M*	Drumette	30C**, 30S
3M	Moela	Nenhuma
4M	Tulipa	49A, 49C, 49S
9M	Drumette	42C
11M	Tulipa	49A, 49C, 49S
12M	Tulipa	32C, 32S, 48C
13M	Drumette	Nenhuma
16M**	Coração	49A, 49C, 49S
18M*	Drumette	12C, 21C, 43C, 50C**
19M**	Coração	13C
22M	Drumette	Nenhuma
24M	Tulipa	8C
26M*	Drumette	13C
27M*	Moela	6C
29M	Moela	Nenhuma
34M	Drumette	Nenhuma
35M*	Drumette	3C, 3S
37M*	Drumette	36A, 36C, 36S
44M	Drumette	Nenhuma
45M	Tulipa	Nenhuma
48M	Coração	9A, 9S, 11C
50M	Tulipa	24A, 24C
51M	Moela	6C
57M	Drumette	Nenhuma

Nas amostras contendo “*” foi necessário fazer o descarte devido à contaminação com bactérias de outras espécies; nas amostras contendo “**” não foi possível fazer a leitura no PFGE.

Das 76 amostras enviadas ao CDPA/UFRGS, sendo 16 de água, 15 de solo, 24 de carne e 21 de cama de aviário, apenas a amostra 32S foi descartada, não sendo possível realizar a Reação em Cadeira da Polimerase (PCR).

A Figura 3 apresenta os genes de patogenicidade encontrados nas cepas de *Escherichia coli* isoladas de 21 amostras de cama de aviário coletadas.

Figura 3 – Genes de patogenicidade encontrados nas cepas de *Escherichia coli* isoladas das amostras de cama de aviário coletadas.

Amostra	<i>sfa/foc</i>	<i>afa/dra</i>	<i>iha</i>	<i>hrla</i>	<i>fimC</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	<i>mat</i>	<i>crl</i>	<i>felA</i>	<i>papG</i>	<i>fimH</i>	TOTAL	%	Amostra
3C	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	5	41,7	3C
6C	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	4	33,3	6C
8C	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	3	25,0	8C
9C	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	9C
11C	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	11C
12C	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	4	33,3	12C
13C	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	6	50,0	13C
21C	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	21C
22C	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	6	50,0	22C
23C	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	23C
24C	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	4	33,3	24C
26C	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	6	50,0	26C
28C	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	4	33,3	28C
30C	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	3	25,0	30C
32C	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	32C
36C	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	4	33,3	36C
42C	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	6	50,0	42C
43C	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	43C
48C	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	48C
49C	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	5	41,7	49C
50C	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	50C
TOTAL	0	1	9	3	20	3	3	19	21	0	21	0			
%	0,0	4,8	42,9	14,3	95,2	14,3	14,3	90,5	100,0	0,0	100,0	0,0			
	<i>sfa/foc</i>	<i>afa/dra</i>	<i>iha</i>	<i>hrla</i>	<i>fimC</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	<i>mat</i>	<i>crl</i>	<i>felA</i>	<i>papG</i>	<i>fimH</i>			

A Figura 4 apresenta os genes de patogenicidade encontrados nas cepas de *Escherichia coli* isoladas de 16 amostras de água coletadas.

Figura 4 – Genes de patogenicidade encontrados nas cepas de *Escherichia coli* isoladas das amostras de água coletadas.

Amostra	<i>sfa/foc</i>	<i>afa/dra</i>	<i>iha</i>	<i>hrla</i>	<i>fimC</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	<i>mat</i>	<i>crl</i>	<i>felA</i>	<i>papG</i>	<i>fimH</i>	TOTAL	%	Amostra
10A	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	16,7	10A
14A	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	5	41,7	14A
18A	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	4	33,3	18A
22A	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	22A
23A	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	3	25,0	23A
24A	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	24A
26A	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	4	33,3	26A
27A	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	4	33,3	27A
28A	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	4	33,3	28A
35A	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	4	33,3	35A
36A	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	4	33,3	36A
39A	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	3	25,0	39A
47A	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	47A
49A	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	49A
51A	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	4	33,3	51A
52A	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	4	33,3	52A
TOTAL	0	0	0	5	12	1	0	15	16	2	14	0			
%	0	0	0	31,25	75	6,25	0	93,75	100	12,5	87,5	0			
	<i>sfa/foc</i>	<i>afa/dra</i>	<i>iha</i>	<i>hrla</i>	<i>fimC</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	<i>mat</i>	<i>crl</i>	<i>felA</i>	<i>papG</i>	<i>fimH</i>			

A Figura 5 apresenta os genes de patogenicidade encontrados nas cepas de *Escherichia coli* isoladas de 14 amostras de solo coletadas.

Figura 5 – Genes de patogenicidade encontrados nas cepas de *Escherichia coli* isoladas das amostras de solo coletadas.

Amostra	<i>sfa/foc</i>	<i>afa/dra</i>	<i>iha</i>	<i>hrla</i>	<i>fimC</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	<i>mat</i>	<i>crl</i>	<i>felA</i>	<i>papG</i>	<i>fimH</i>	TOTAL	%	Amostra
3S	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	4	33,3	3S
4S	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	4	33,3	4S
5S	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	5S
9S	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	9S
22S	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	22S
23S	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	5	41,7	23S
25S	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	16,7	25S
26S	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	16,7	29S
28S	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	16,7	30S
29S	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	3	25,0	32S
30S	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	3	25,0	36S
36S	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	16,7	53S
49S	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	16,7	26S
53S	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	3	25,0	28S
TOTAL	0	0	0	3	6	0	0	12	14	5	7	0			
%	0,0	0,0	0,0	21,4	42,9	0,0	0,0	85,7	100,0	35,7	50,0	0,0			
	<i>sfa/foc</i>	<i>afa/dra</i>	<i>iha</i>	<i>hrla</i>	<i>fimC</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	<i>mat</i>	<i>crl</i>	<i>felA</i>	<i>papG</i>	<i>fimH</i>			

A Figura 6 apresenta os genes de patogenicidade encontrados nas cepas de *Escherichia coli* isoladas de 24 amostras de carne coletadas.

Figura 6 – Genes de patogenicidade encontrados nas cepas de *Escherichia coli* isoladas das amostras de carne coletadas.

Amostra	<i>sfa/foc</i>	<i>afa/dra</i>	<i>iha</i>	<i>hrla</i>	<i>fimC</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	<i>mat</i>	<i>crl</i>	<i>felA</i>	<i>papG</i>	<i>fimH</i>	TOTAL	%	Amostra
2M	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	7	58,3	2M
3M	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	6	50,0	3M
4M	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	7	58,3	4M
9M	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	7	58,3	9M
11M	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	5	41,7	11M
12M	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	6	50,0	12M
13M	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	4	33,3	13M
16M	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	5	41,7	16M
18M	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	6	50,0	18M
19M	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	3	25,0	19M
22M	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	3	25,0	22M
24M	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	24M
26M	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	26M
27M	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	6	50,0	27M
29M	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	29M
34M	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	16,7	34M
35M	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	7	58,3	35M
37M	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	6	50,0	37M
44M	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	6	50,0	44M
45M	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	7	58,3	45M
48M	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	7	58,3	48M
50M	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	6	50,0	50M
51M	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	51M
57M	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	5	41,7	57M
TOTAL	6	14	12	1	24	1	4	20	24	2	23	0			
%	25,0	58,3	50,0	4,2	100,0	4,2	16,7	83,3	100,0	8,3	95,8	0,0			
	<i>sfa/foc</i>	<i>afa/dra</i>	<i>iha</i>	<i>hrla</i>	<i>fimC</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	<i>mat</i>	<i>crl</i>	<i>felA</i>	<i>papG</i>	<i>fimH</i>			

2.1.4 Discussão

2.1.4.1 Positividade por substrato

A presença de bactérias em instalações avícolas é muito comum, pois nos moldes atuais de produção, as aves vivem sobre as próprias excretas. Mo et al. (2017) relatam que na produção de frangos é provável que as bactérias estejam presentes em suspensão, em superfícies e, ocasionalmente, em biofilmes. Por ser uma bactéria comensal do trato digestivo, já era esperado que o número de positividade de *E. coli* para cama de aviário fosse superior a 90%, porém, esperava-se um pouco mais de positividade em amostras de solo. Como nem todas as amostras de solo foram coletadas em locais adubados com dejetos de animais ou com trânsito de animais, e por estarem aproximadamente cinco cm abaixo da terra onde não corria o risco das bactérias serem eliminadas por raios ultravioletas, o valor de 26,3% parece representar a realidade do meio rural.

A região estudada é caracterizada por um grande número de pequenas propriedades rurais, muito próximas umas das outras e com uma elevada densidade animal, predispondo a contaminação das fontes de água. A água disponibilizada por cisternas, como foi o caso de algumas amostras, é coletada por calhas no telhado dos aviários e segundo Silva et al. (2012), em água coletada da chuva pode ser detectado a presença de *Escherichia coli* oriunda de contaminação fecal. Todas as fontes de água coletadas na pesquisa eram utilizadas para a dessedentação das aves e livres de cloro (para não eliminar a *E. coli*), sendo que os 28,1% de positividade ressaltam a importância do tratamento da água de bebida.

O solo e os recursos hídricos estão diretamente relacionados, sobretudo em localidades com alta pluviosidade, que predispõe a lixiviação de nutrientes e microrganismos. Para reduzir o risco de alguns patógenos se movimentarem por escoamento e contaminar as fontes de água de propriedades rurais, pode-se fazer o controle da taxa de aplicação de dejetos animais, analisar os nutrientes do adubo antes da aplicação, considerar as condições do clima e do solo, além de observar as características da planta que receberá o adubo (PALHARES et al., 2014).

De todas as amostras de carne, houve positividade em 42,1% das amostras. Isso provavelmente ocorreu devido à contaminação cruzada dentro do frigorífico em estruturas tais como o *chiller*. Geornaras et al. (1996) confirmam essa hipótese afirmando que em abatedouro de aves, bactérias podem contaminar a superfícies de equipamentos, a água utilizada no *chiller*, as correntes de ar do abatedouro e as mãos dos manipuladores, resultando

na contaminação cruzada entre as carcaças. Do total de amostras de miúdos coletados (32 entre coração e moela), 21,9% apresentaram positividade para *E. coli* contra 68% das amostras de cortes (25 entre drumette e tulipa), isso provavelmente se deve ao fato dos miúdos passarem por um processo de lavagem. Ferreira et al. (2018) ao avaliarem alguns estudos epidemiológicos, comentam que nos casos em que há alta contaminação de carcaças de frangos, existe grandes chances das cepas de *E. coli* atuarem como fonte de ExPEC para humanos.

2.1.4.2 Clones

Através da técnica de PFGE foram encontrados dois pares de clones em água, três pares em solo e cinco pares em carne. O fato de não ter sido encontrado nenhum clone em cama de aviário pode ser devido ao fato desse substrato conter um alto *log* de *E. coli*, já que é uma das principais bactérias comensais do trato digestivo, além de que, foi coletado um único *pool* de amostra (três pontos) com apenas uma colônia isolada por meio de cultivo. Boratto et al. (2004) comenta que em um grama de fezes de frango de corte pode haver cerca de 10^6 UFC de *E. coli*, reforçando a hipótese da ausência de clones.

Reeves et al. (2011), estudando uma residência por três anos, a qual incluía também um cão, comentam que isolar um clone em um ponto de amostragem específico em eventos sucessivos pode não se tratar apenas de uma persistência do clone, mas sim, que os membros da família estão readquirindo-o. Isso sugere que se o presente trabalho fosse repetido nas mesmas localidades, poderia haver um grande número de clones entre o primeiro e o segundo ciclo de coletas.

Um estudo observacional conduzido por Boulianne et al. (2016) com lotes de frango e perus produzidos em Québec (Canadá) mostrou que perus produzidos em aviários com cama reaproveitada de frango apresentaram resistência ao ceftiofur, que era a droga mais utilizada a nível de incubatório em frango (76% dos lotes), enquanto a droga mais utilizada em perus era a espectinomicina (42% dos lotes). Esse estudo demonstra que a contaminação dos lotes sequentes é uma realidade quando não ocorre a lavagem das instalações no intervalo entre lotes, tornando-se assim, um sistema de recontaminação cíclico (intra ou interespecie de aves).

Descarta-se totalmente a chance de contaminação cruzada, pois as coletas das amostras e manipulações laboratoriais seguiram rigorosamente o protocolo. O fato de que, dos cinco pares de clones ambientais somente dois foram coletados e manipulados no mesmo dia, fortalece essa hipótese. Não foi realizado o registro do dia da compra das amostras de carne,

nem de quando foram manipuladas no laboratório, visto que eram armazenadas sob congelamento até se ter um número de no mínimo sete amostras para viabilizar os procedimentos laboratoriais, então, sabe-se apenas o dia em que foram embaladas pela indústria. É importante destacar que os cinco clones identificados em carnes eram de cortes diferentes, sendo que apenas um coincidiu com o mesmo dia de embalagem, o que sugere que existe forte persistência da bactéria a nível de frigorífico, mesmo com os rigorosos procedimentos de higienização.

2.1.4.3 Relações epidemiológicas

Dentro da própria granja pode haver o trânsito de bactérias de diversas formas: da cama do aviário, elas podem chegar ao solo através da adubação orgânica; a água pode receber bactérias do solo através da lixiviação com a chuva; a cama do aviário pode receber bactérias do solo através do calçado do produtor rural e do trânsito de roedores; e a cama do aviário pode receber bactérias através da água de dessedentação não tratada (TELES, 2018).

Apesar de todas as granjas seguirem os padrões de uma mesma empresa integradora, cada família possui as suas particularidades, principalmente no que tange os cuidados com higiene pessoal e de instalações. Rwego et al. (2008), analisando 672 isolados de *E. coli* obtidos de fezes de humanos e bovinos em duas comunidades no oeste rural de Uganda, além de encontrarem uma distância genética muito baixa entre humanos e animais, perceberam que pessoas que não lavavam as mãos antes das refeições abrigavam bactérias duas vezes mais semelhantes às aquelas encontradas em bovinos. Já Ueda et al. (2015), coletando 199 amostras fecais de humanos pertencentes a 47 domicílios em uma área rural do Vietnã e um suabe retal de um frango de cada domicílio (47 amostras no total), não encontraram nenhum conjunto de isolados com o mesmo perfil genômico entre aves e humanos. Os achados dos pesquisadores podem sugerir que diferentes tipos de *E. coli* podem ter predileções por aves ou mamíferos (nesse caso, o homem), ou que o fato da região de Uganda ser mais pobre que a do Vietnã, favorece a transmissão das bactérias por falta de higiene pessoal. Trabalhos futuros semelhantes a presente pesquisa podem considerar também a coleta de amostras de fezes das famílias que vivem nas propriedades rurais, que além da correlação entre substratos, pode ser feita a correlação interespecie (humanos x aves).

O fato de terem sido encontrados apenas clones dentro do mesmo tipo de substrato, indica que cada tipo de *E. coli* possui necessidades específicas para o seu desenvolvimento. Reeves et al. (2011) comentam que as estruturas populacionais das bactérias são diferentes

das dos organismos mais complexos, fazendo com que a baixa frequência de recombinação gênica em relação à reprodução permita o desenvolvimento de múltiplos clones adaptados a nichos específicos, como é o caso de haver vários clones da *E. coli* O157:H7 causadoras de síndrome urêmica hemolítica.

Qualquer presença de *E. coli*, por mais inofensiva que seja, precisa ser acompanhada com seriedade. Kemmet et al. (2013) afirmam que *E. coli* intestinal portadora de numerosos VAGs (*Virulence-Associated Genes*) podem ser chamadas de populações “potenciais” de *E. coli* Patogênica Aviária (pAPEC), fazendo com que a sua presença aumente o risco de doenças sistêmicas em aves. Esse mesmo princípio vale para cepas presentes em alimentos, advindos da avicultura ou não, mas que podem contaminar seres humanos.

No Quadro 3 observa-se que não foi possível fazer muita correlação entre amostras de carne e amostras de campo, mesmo que todas as granjas amostradas estão integradas ao frigorífico há pelo menos cinco anos, garantindo um intercâmbio cíclico. Um ponto a considerar é que as amostras de carne foram correlacionadas apenas com os dias de abate da granja, porém, pode haver situações em que cepas de *E. coli* presentes nos frangos das granjas estudadas e que foram abatidos em dias anteriores ao do embalo das carnes adquiridas no mercado, permaneceram no frigorífico fazendo uma posterior contaminação cruzada.

Jakobsen et al. (2010) selecionaram 25 cepas de *E. coli* pertencentes ao grupo clonal A (CgA) para a realização de PFGE oriundas de frangos de corte, carne de frango, humanos saudáveis e humanos hospitalizados com infecção urinária aguda, sendo que não encontraram perfis relacionados de animais e carne de frango com humanos hospitalizados ou não. Porém, os autores sugerem que, o fato de haver cepas semelhantes isoladas de humanos de diferentes localidades (inclusive um par de clones), pode ser devido ao consumo de carne de aves por ser uma fonte comum entre os humanos estudados. No entanto, não se pode banalizar a produção animal como causa de todos os surtos ou presença de clones em diferentes localidades, já que os seres humanos possuem diversos hábitos em comum que não se restringem apenas ao consumo de proteína animal.

Bortolaia et al. (2010) estudando *E. coli* isolada de lotes de matrizes e frangos de corte sem a utilização de antimicrobianos na Dinamarca, encontraram clones entre lotes de frango de corte de diferentes localidades, em que o incubatório foi único local em comum passível de transmissão de bactéria entre eles. Os mesmos autores encontraram uma pequena diferença genética entre os isolados dos lotes de frango de corte e as suas matrizes, suportando a hipótese de que a transmissão vertical de múltiplas linhagens resistentes é mais importante do

que a transmissão local por fatores ambientais, visto que a biossegurança em avicultura está bastante avançada.

2.1.4.4 Genes de patogenicidade

Rocha et al. (2017) afirmam que os genes *sfa/foc*, *afa/dra*, *iha*, *hrla*, *fimC*, *fimH*, *papC*, *papG*, *tsh*, *mat*, *crl* e *felA* são responsáveis pela capacidade de adesão das bactérias. Os mesmos autores analisaram 460 cepas de APEC e 450 cepas de UPEC (*Escherichia coli* uropatogênica), encontrando um grande número desses genes em ambos os patótipos. Na presente pesquisa foi possível encontrar vários desses genes dentre todos os isolados dos diferentes tipos de substrato, sendo que os mais prevalentes foram o gene *crl* (100,0%), *mat* (88,0%), *papG* (86,7%) e *fimC* (82,7%). É importante ressaltar que 80% das infecções do trato urinário em seres humanos são devido à UPEC que habita o trato digestivo juntamente com cepas comensais e têm acesso à bexiga através da uretra (MOBLEY & ALTERI, 2015). Sendo assim, *E. coli* presente em carne de frango poderia disponibilizar esses genes de adesão para *E. coli* presente no trato digestivo de seres humanos, aumentando o seu potencial de virulência.

Ferreira et al. (2018) avaliaram 44 cepas de *E. coli* comensais consideradas multirresistentes isoladas de frangos de corte no Brasil e encontraram em 100% delas a presença do gene *fimH*, o que não corresponde com nossos achados, pois dos isolados de todos os substratos avaliados, não foi encontrada a presença desse gene. Da mesma forma, o presente estudo obteve grande prevalência do gene *papG* (100% nas amostras de cama de aviário), o que não ocorreu no estudo de Ferreira et al. (2008), obtendo 25% de *papGI*, 25% de *papGII* e 2,3% de *papGIII*. Esse achado pode sugerir que exista uma proporcionalidade inversa entre alguns genes, como foi o caso de *fimH* e *papG*. Corroborando com Ferreira et al. (2018), Al-Kandari & Woodward (2018) em um estudo realizado na Inglaterra, também encontraram alta prevalência do gene *fimH*, sendo de 97,1% em *E. coli* isolada de 35 frangos saudáveis e 96,9% em *E. coli* confirmada como APEC isolada de 65 frangos.

Crecencio et al. (2018) pesquisaram os mesmos genes do presente trabalho em 31 cepas de *E. coli* classificadas como formadoras de biofilme e isoladas de carcaças de frangos comercializadas no Oeste de Santa Catarina, encontrando 83,87%, 77,41%, 64,51% e 19,35% de presença dos genes *fimC*, *papG*, *crl* e *mat* respectivamente, não sendo encontrado os genes *sfa/foc*, *iha*, *felA* e *fimH*. Da mesma forma que Crecencio et al. (2018), não foram encontrados nas amostras de carne o gene *fimH*, porém obteve-se 50%, 25% e 8,3% (duas amostras) dos

genes *iha*, *sfa/foc* e *felA* respectivamente. Outro ponto a considerar é que os pesquisadores encontraram apenas uma cepa contendo o gene *afa/dra* e afirmaram que seria o primeiro relato desse gene em carnes brasileiras. Porém, no presente trabalho, em 24 cepas isoladas de carne de frango, 14 cepas (58,3%) possuíam o gene *afa/dra*.

Dos 10 pares de clones encontrados, seis deles não foram idênticos nos 12 genes pesquisados (sendo desses, cinco pares isolados de carne), o que demonstra que pode existir troca plasmidial entre as bactérias, ocasionando pequenas alterações genéticas e que não seriam perceptíveis na técnica PFGE. Os plasmídeos são moléculas de DNA encontradas no citoplasma das células bacterianas, que apesar de serem herdadas por ambas as células filhas durante a divisão celular, possuem a capacidade de se multiplicarem independentemente do cromossomo (SUMMERS, 1996) e serem transmitidas para outras bactérias através de uma organela chamada pili conjugativa (HAFT et al., 2009).

2.1.5 Conclusão

Segundo a técnica de Eletroforese em Campo Pulsante (PFGE) foram encontrados 10 pares de clones, sendo que desses pares, seis de não foram totalmente idênticos nos 12 genes de patogenicidade (adesina) estudados, podendo indicar uma interferência plasmidial. Desses seis pares, cinco deles foram isolados de carne, sugerindo que bactérias presentes em carnes são mais susceptíveis a trocar material genético via conjugação do que aquelas presentes no meio ambiente.

O fato de todos os clones estarem no mesmo substrato (água-água, solo-solo e carne-carne) implica que determinadas cepas de *Escherichia coli* têm preferências por onde se desenvolver, tornando a transferência de um tipo de substrato para outro mais difícil de ocorrer. Entretanto, importantes genes de patogenicidade foram encontrados ao longo da cadeia produtiva de frango de corte, principalmente os genes *crl* (100,0%), *mat* (88,0%), *papG* (86,7%) e *fimC* (82,7%). Esses genes também são prevalentes em *E. coli* uropatogênica (UPEC), que é responsável por infecções do trato urinário de seres humanos.

Apesar de o presente trabalho ter sido desenvolvido apenas com a bactéria *E. coli*, ele auxilia no entendimento da dinâmica das demais enterobactérias de importância em saúde pública.

2.1.6 Referências utilizadas no artigo

AL-KANDARI, F.; WOODWARD, M. J. Genotypic and phenotypic diversity differences of presumptive commensal and avian pathogenic *E. coli*. **British Poultry Science**, accept 05 Out 2018.

BORATTO, A. J. et al. Uso de antibiótico, de probiótico e de homeopatia, em frangos de corte criados em ambiente de conforto, inoculados ou não com *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1477-1485, 2004.

BORSOI, A. et al. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two brazilian isolates of *Salmonella Heidelberg* strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v. 88, p. 750-758, 2009.

BORTOLAIA, V. et al. Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* within the broiler industry. **Veterinary Microbiology**, v. 142, 2010.

BOULIANNE, M. Drug use and antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolates from chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 80, 2016.

CAMARGO, L. R. P.; SUFFREDINI, I. B. Impacto causado por *Escherichia coli* na produção de animais de corte no Brasil: revisão de literatura. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 33, n. 2, p. 193-197, 2015.

CARRIÇO, J.A., et al. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5483-5490, 2005.

CRECENCIO, R. et al. **Caracterização genotípica de patogenicidade e resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* provenientes de carne de frango**. 2018. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, 2018.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2001.

EWERS, C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 3, p. 163-176, 2007.

FERREIRA, C. F. et al. Virulence potential of commensal multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**. Accepted date: 28 July 2018.

GEORNARAS, I. et al. Bacterial populations associated with poultry processing in a South African abattoir. **Food Microbiology**, v. 13, p. 457-465, 1996.

HAFT, R. J. F. et al. Competition favours reduced cost of plasmids to host bacteria. **The ISME Journal**, v.3, n. 7, p. 761-769, 2009.

JAKOBSEN, L. et al. Detection of clonal group A *Escherichia coli* isolates from broiler chickens, broiler chicken meat, community-dwelling humans, and urinary tract infection (UTI) patients and their virulence in a mouse UTI model. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 24, 2010.

JANSSEN, T. et al. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 5, p. 371-378, 2001.

JOHNSON, J. R.; STEEL, 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, n. 1, p. 261-272, 2000.

KEMMET, K. et al. A longitudinal study simultaneously exploring the carriage of APEC virulence associated genes and the molecular epidemiology of faecal and systemic *E. coli* in commercial broiler chickens. **Plos One**, v. 8, i. 6, 2013.

MAGALHÃES, V. D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MAURER, J. J. et al. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli and temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Disease**, v. 42, n. 1, p. 106-118, 1998.

MO, S. S. et al. Transfer potential of plasmids conferring extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* from poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 12, 2017.

MPELLE, F. L. et al. First report of the types TEM, CTX-M, SHV and OXA-48 of beta-lactamases in *Escherichia coli*, from Brazzaville, Congo. **African Journal of Microbiology Research**, v. 13(8), 2019.

PALHARES, J. C. P. et al. *Salmonella* and antimicrobial resistance in an animal-based agriculture river system. **Science of the Total Environment**, v. 472, 2014.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

REEVES, P. R. et al. Rates of mutation and host transmission for an *Escherichia coli* clone over 3 years. **Plos One**, v. 6, i. 10, 2011.

RIBOT, E. M. et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, p. 59-67, 2006.

RWEGO, I. B. High Rates of *Escherichia coli* transmission between livestock and humans in rural Uganda. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 10, 2008.

SILVA, C. V. et al. Cisternas para armazenamento de água de chuva e efeito na diarreia infantil: um estudo na área rural do semiárido de Minas Gerais. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 17, n. 4, 2012.

SUMMERS, D. K. The biology of plasmids. **Blackwell Science**, Oxford, 1996.

TELES, P. F. S. **Pesquisa epidemiológica em granjas produtoras de frangos de corte na região de Chapecó-SC**. Chapecó-SC, 15/05/2018. Nota de entrevista.

UEDA, S. et al. Limited transmission of bla CTX-M-9-type-positive *Escherichia coli* between humans and poultry in Vietnam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, 2015.

3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo a técnica de Eletroforese em Campo Pulsante (PFGE) foram encontrados 10 pares de clones, sendo que desses pares, seis não foram totalmente idênticos nos 12 genes de patogenicidade (adesina) estudados, podendo indicar uma interferência plasmidial. Desses seis pares, cinco deles foram isolados de carne, sugerindo que bactérias presentes em carnes são mais susceptíveis a trocar material genético via conjugação do que aquelas presentes no meio ambiente.

O fato de todos os clones estarem no mesmo substrato (água-água, solo-solo e carne-carne) implica que determinadas cepas de *Escherichia coli* têm preferências por onde se desenvolver, tornando a transferência de um tipo de substrato para outro mais difícil de ocorrer. Entretanto, importantes genes de patogenicidade foram encontrados ao longo da cadeia produtiva de frango de corte, principalmente os genes *crl* (100,0%), *mat* (88,0%), *papG* (86,7%) e *fimC* (82,7%). Esses genes também são prevalentes em *E. coli* uropatogênica (UPEC), que é responsável por infecções do trato urinário de seres humanos.

Apesar de o presente trabalho ter sido desenvolvido apenas com a bactéria *E. coli*, ele auxilia no entendimento da dinâmica das demais enterobactérias de importância em saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ABPA. **Estatísticas/Desempenho de produção**. Disponível em: <www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>. Acesso em: 4 jun. 2018.
- AL-KANDARI, F.; WOODWARD, M. J. Genotypic and phenotypic diversity differences of presumptive commensal and avian pathogenic *E. coli*. **British Poultry Science**, accept 05 Out 2018.
- AMARAL, L. A. et al. Qualidade higiênico-sanitária e demanda de cloro da água de dessedentação de galinhas de postura coletadas em bebedouros tipo nipple e taça. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 3, p. 249-255, 2001.
- AMARAL, L. A. et al. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, p. 510-514, 2003.
- ANTAO, E. M., et al. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**. v. 1, n. 22, 2009.
- BORATTO, A. J. et al. Uso de antibiótico, de probiótico e de homeopatia, em frangos de corte criados em ambiente de conforto, inoculados ou não com *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1477-1485, 2004.
- BORSOI, A. et al. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two brazilian isolates of *Salmonella Heidelberg* strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v. 88, p. 750-758, 2009.
- BORTOLAIA, V. et al. Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* within the broiler industry. **Veterinary Microbiology**, v. 142, 2010.
- BOULIANNE, M. Drug use and antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolates from chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 80, 2016.
- BRASIL FOODS. **Manual de boas práticas de produção em frangos de corte**. Curitiba: BRF, 2014.
- CAMARGO, L. R. P.; SUFFREDINI, I. B. Impacto causado por *Escherichia coli* na produção de animais de corte no Brasil: revisão de literatura. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 33, n. 2, p. 193-197, 2015.
- CARRIÇO, J.A., et al. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5483-5490, 2005.
- CORDONI, G. et al. Comparative genomics of European avian pathogenic *E. Coli* (APEC). **BMC Genomics**, n. 17, 2016.

COTTA, T. et al. **Produção de frangos de corte**. Viçosa : CPT, 2008.

CRECENCIO, R. et al. **Caracterização genotípica de patogenicidade e resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* provenientes de carne de frango**. 2018. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, 2018.

CUNHA, M. P. V. et al. A similaridade genética de *Escherichia coli* patogênica para as aves (APEC) com estirpes humana e a resistência antimicrobiana justificam a preocupação sanitária em relação aos produtos de origem aviária? **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 11, n. 2, p. 24-33, 2013.

DE PAULA JUNIOR, S. E. M. **Avaliação das alternativas de disposição final do resíduo da produção de frango de corte: cama de frango**. 2014. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods**. 4.ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2001.

EWERS, C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 3, p. 163-176, 2007.

FERREIRA, C. F. et al. Virulence potential of commensal multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**. Accepted date: 28 July 2018.

FREITAS, et al. Água subterrânea: um recurso vital para o oeste catarinense. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 2002, São Paulo. **Anais eletrônicos...** São Paulo: Associação Brasileira de Águas Subterrâneas, 2002. Disponível em: <<https://aguassubterraneas.abas.org/asubterraneas/article/view/22722>>. Acesso em: 09 set. 2019.

GEORNARAS, I. et al. Bacterial populations associated with poultry processing in a South African abattoir. **Food Microbiology**, v. 13, p. 457-465, 1996.

HAFT, R. J. F. et al. Competition favours reduced cost of plasmids to host bacteria. **The ISME Journal**, v.3, n. 7, p. 761-769, 2009.

HAYES F. Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 3-29, 2003.

ISHII, S.; SADOWSKY, M. J. *Escherichia coli* in the environment: Implications for water quality and human health. **Microbes And Environments**, v. 23(2), p. 101-108, 2008.

JAKOBSEN, L. et al. Detection of clonal group A *Escherichia coli* isolates from broiler chickens, broiler chicken meat, community-dwelling humans, and urinary tract infection (UTI) patients and their virulence in a mouse UTI model. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 24, 2010.

JANSSEN, T. et al. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 5, p. 371-378, 2001.

JOHNSON, J. R.; STEEL, 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, n. 1, p. 261-272, 2000.

KEMMET, K. et al. A longitudinal study simultaneously exploring the carriage of APEC virulence associated genes and the molecular epidemiology of faecal and systemic *E. coli* in commercial broiler chickens. **Plos One**, v. 8, i. 6, 2013.

LLOSA, M. et al. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. **Molecular Microbiology**, v. 45, p. 1-8, 2002.

MAGALHÃES, V. D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MANGES, A. R.; JOHNSON, J.R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Disease**, v. 55, Ed. 5, p. 712-719, 2012.

MAURER, J. J. et al. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli and temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Disease**, v. 42, n. 1, p. 106-118, 1998.

MITTELSTAEDT, S.; CARVALHO, V. M. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157: H7-revisão. **Journal Health Science Institute**, v. 24, n. 3, 2006.

MOBLEY, H. L. T.; ALTERI, C.J. Development of a vaccine against *Escherichia coli* urinary tract infections. **Pathogens**, v. 5, p. 1-8, 2015.

MO, S. S. et al. Transfer potential of plasmids conferring extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* from poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 12, 2017.

MPELLE, F. L et al. First report of the types TEM, CTX-M, SHV and OXA-48 of beta-lactamases in *Escherichia coli*, from Brazzaville, Congo. **African Journal of Microbiology Research**, v. 13 (8), 2019.

OLIVEIRA, A. V. B. et al. Padrões microbiológicos da carne de frango de corte – referencial teórico. **Revista Verde**, v. 6, n. 3, p. 01-16, 2011.

PALHARES, J. C. P. et al. *Salmonella* and antimicrobial resistance in an animal-based agriculture river system. **Science of the Total Environment**, v. 472, 2014.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

REEVES, P. R. et al. Rates of mutation and host transmission for an *Escherichia coli* clone over 3 years. **Plos One**, v. 6, i. 10, 2011.

RIBOT, E. M. et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, p. 59-67, 2006.

ROCHA, S. L. S. et al. Classificação de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) em grupos filogenéticos e associação com a patogenicidade *in vivo*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, 2017.

RWEGO, I. B. High Rates of *Escherichia coli* Transmission between livestock and humans in rural Uganda. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 10, 2008.

SILVA, C. H. P. M. E; NEUFELD, P. M. **Bateriologia e micologia para o laboratório clínico**. Rio de Janeiro: Revinter., 2006.

SILVA, C. V. et al. Cisternas para armazenamento de água de chuva e efeito na diarreia infantil: um estudo na área rural do semiárido de Minas Gerais. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 17, n. 4, 2012.

SILVA, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* 0157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 167-173, 2003.

SMITH, J. Superinfection drives virulence evolution in experimental population of bacteria and plasmids. **Evolution**, v. 65, n. 3, p. 831-840, 2010.

SOUZA, L. H. L. A manipulação inadequada dos alimentos: Fator de contaminação. Higiene de alimentos. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 20, n. 146, 2016. Disponível em: <http://www.aedb.br/seget/arquivos/artigos05/42_artigo%20seget.pdf>. Acesso em 12 de novembro de 2018.

SOUZA, J. A. A. et al. Contaminação microbiológica do perfil do solo com esgoto sanitário. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 33, n. 1, p. 5-8, 2011.

SUMMERS, D. K. The biology of plasmids. **Blackwell Science**, Oxford, 1996.

TELES, P. F. S. **Pesquisa epidemiológica em granjas produtoras de frangos de corte na região de Chapecó-SC**. Chapecó-SC, 15/05/2018. Nota de entrevista.

UEDA, S. et al. Limited transmission of bla CTX-M-9-type-positive *Escherichia coli* between humans and poultry in Vietnam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, 2015.