

UNIVERSIDADE PAULISTA

**PESQUISA DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA E
Salmonella spp. EM CALOPSITAS (*Nymphicus*
hollandicus) MANTIDAS EM CATIVEIRO: potencial
zoonótico e sensibilidade antimicrobiana**

PATRICIA SILVEIRA DE PONTES

SÃO PAULO

2015

PATRICIA SILVEIRA DE PONTES

PESQUISA DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA E *Salmonella* spp. EM CALOPSITAS (*Nymphicus* *hollandicus*) MANTIDAS EM CATIVEIRO: potencial zoonótico e sensibilidade antimicrobiana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Selene Dall' Acqua Coutinho.

SÃO PAULO

2015

Pontes, Patrícia Silveira de.

Pesquisa de *Escherichia coli* patogênica e *Salmonella spp.* em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) mantidas em cativeiro: potencial zoonótico e sensibilidade antimicrobiana / Patrícia Silveira de Pontes.
- 2015.

61 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2015.

Área de Concentração: Doenças Infecciosas de animais Domésticos e Selvagens.

Orientadora: Prof.^a Dra. Selene Dall' Acqua Coutinho.

1. APEC. 2. Calopsita. 3. *Escherichia coli*. 4. *Nymphicus*

PATRICIA SILVEIRA DE PONTES

PESQUISA *Escherichia coli* PATOGÊNICA E *Salmonella* spp. EM CALOPSITAS (*Nymphicus hollandicus*) MANTIDAS EM CATIVEIRO: potencial zoonótico e sensibilidade antimicrobiana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/____/____

Prof^a. Dr^a. Selene Dall'Acqua Coutinho – UNIP

_____/____/____

Prof^a Dr^a Maria Anete Lallo – UNIP

_____/____/____

Prof^a Dr^a Terezinha Knöbl – USP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família pelo apoio e paciência durante todo este caminho; e em especial dedico à minha mãe, muito mais do que pela vida, mas por me apoiar em minhas decisões, por todo o seu amor, paciência, por estar ao meu lado sempre, pelos sacrifícios feitos ao longo de toda a minha formação, e por toda dedicação que foi essencial em cada passo dado durante a concretização de mais esta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por todas as oportunidades a mim oferecidas, por iluminar meus caminhos e me guiar durante minhas decisões.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Selene Dall' Acqua Coutinho, por ter me acolhido e abraçado minha pesquisa num momento tão difícil a todos. Pela paciência, apoio, orientação, carinho e dedicação empenhados neste trabalho.

À Universidade Paulista, pela disponibilização do laboratório de microbiologia e biologia molecular, assim como os profissionais que nele atuam, pelo suporte financeiro e pela oportunidade de aprendizagem no processo de obtenção do título de mestre.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), fundação do Ministério da Educação (MEC), que, por meio do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP), financiou a mensalidade deste curso.

À querida Prof^a Dr^a Vania Maria de Carvalho, por todo carinho, ensinamento, paciência, orientação e dedicação a esse trabalho. E por acreditar em meu potencial e me trazer para o mundo da microbiologia.

À minha querida amiga Ms Renata de Oliveira Iovine, por toda paciência e conhecimento compartilhado. Por estar ao meu lado nos momentos difíceis e sempre disposta a me auxiliar nas dificuldades encontradas ao longo dessa pesquisa.

À Dr^a Fabiana Toshie de Camargo Konno, pelo apoio, disponibilidade e conhecimento dedicados a este trabalho.

À Suzana Maria Bezerra e Cleide Marques da Silva Santana pela amizade, paciência, apoio e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

À Prof^a Dr^a Terezinha Knöbl e ao Ms Marcos Paulo Vieira Cunha, pelos conhecimentos compartilhados e pela realização de etapa tão importante deste trabalho.

Aos professores do programa e aos colegas mestrandos e doutorandos, por todo conhecimento construído ao longo desta jornada.

À minha família por todo apoio e paciência.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta fase de minha vida.

“Não tenho nenhum talento especial, só tenho paixão em minha curiosidade”

(Albert Einstein)

RESUMO

O conhecimento sobre o microbioma intestinal de aves clinicamente saudáveis mantidas como *pet* é auxiliar na compreensão da epidemiologia das doenças bacterianas que acometem aves e humanos, tendo em vista o contato estreito que proprietários mantém com seus animais de companhia. Este trabalho objetivou a pesquisa de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* com potencial zoonótico em material cloacal de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) saudáveis mantidas como animais de companhia (*pet*), bem como, o estudo de sua sensibilidade aos antimicrobianos. Foram colhidos swabs cloacais de 94 aves clinicamente saudáveis, mantidas em criatórios comerciais, *pet shops* ou domiciliadas. As amostras foram semeadas em água peptonada e ágar MacConkey. Após identificação fenotípica, três cepas de *E. coli* de cada indivíduo foram submetidas à pesquisa dos genes relacionados às *extraintestinal pathogenic E. coli* (ExPEC) (*papC*, *papEF*, *sfa*, *cnf1*, *malX*, *fyuA*, *cvaC*, *sfa*, *hly*), incluindo os genes preditores de virulência para aves (APEC) (*ironN*, *ompT*, *hlyF*, *iss* e *iutA*); à pesquisa de marcadores de *E. coli* diarreogênica (*ST*, *LT*, *ial*, *eagg*, *eae*, *stx1* e *stx2*) e classificadas de acordo com os grupos filogenéticos A, B1, B2 e D. Realizou-se a sorotipagem dos isolados com o sorotipo O157 H7. A pesquisa de sensibilidade aos antimicrobianos seguiu padronização internacional. Pesquisou-se os seguintes genes nas amostras resistentes: *blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA*, CMY, CTX-M, *tetA*, *tetB*, *aadA*, *aphA*, *strAB*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *qnrA*, *qnrD*, *qnrB*, *qnrS*, *oqxAB*, *aac*, *qnrC* e *qepA* e os marcadores para os plasmídeos de grupo Inc K/B, W, FIIA, FIA, FIB, Y, I1, F, X, HI1, N, H12 e L/M. Não se verificou *Salmonella* sp nos animais pesquisados. Isolou-se 27 cepas de *E. coli* de nove dos 94 animais (10%). A combinação de 4 genes APEC (*ironN*, *ompT*, *iss* e *hlyF*) foi detectada em duas cepas (2/27-7%); *iss* (1/27-4%) em um isolado. Dos 27 isolados, seis (22%) foram classificados no grupo filogenético A; 18 (67%) em B1, três cepas (11%) em B2 e nenhum em D. Não houve soroaglutinação com o antissoro O157 H7. Os maiores índices de resistência foram observados perante amoxicilina (22/27-82%), ampicilina (21/27-79%), estreptomicina (18/27-67%) e tetraciclina (11/27-40,7%). Dezenas isolados (59%) de sete animais diferentes apresentaram multirresistência. Os genes de resistência observados foram *strAB*, *blaTEM*, *tetA*, *tetB*, *aadA*, *aphA*, *sul1*, *sul2* e *sul3*. Plasmídeos de resistência estiveram presentes em 20 cepas, sendo eles IncFIB (18/27), IncFIA (3/27), IncY (2/27) e IncI1(4/27). Apesar da baixa percentagem de

isolados com potencial patogênico, foi significativa a resistência antimicrobiana das cepas isoladas de calopsitas saudáveis mantidas em cativeiro, incluindo multirresistência. O papel dos *pets* na manutenção e disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos tem sido tema relevante na Saúde Pública. Ressalta-se, portanto, a importância de cuidados sanitários entre os proprietários e suas aves, bem como um maior controle na utilização de antimicrobianos em animais.

Palavras-chave: APEC; Calopsita; *Escherichia coli*; *Nymphicus hollandicus*; *Salmonella* spp.; sensibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT

Understanding the composition of the intestinal microbiome of clinically healthy pet birds offers an important insight into the epidemiology of bacterial diseases affecting captive birds and humans, mainly for the close contact that owners have with their pets. This research evaluated the presence and antimicrobial sensitivity of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* with zoonotic potential isolated from cloacal swabs of healthy pet cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). Samples from 94 clinically healthy birds from commercial breeders and private homes were seeded in peptone water and agar MacConkey. After phenotypic identification, three *E. coli* strains from each individual underwent *extraintestinal pathogenic E. coli* (ExPEC) (*papC*, *papEF*, *sfa*, *cnf1*, *malX*, *fyuA*, *cvaC*, *sfa*, *hly*) genes research, including genes of avian virulence predictor (AVP) (*ironN*, *ompT*, *hlyF*, *iss* e *iutA*); research of *diarreiogenic E. coli* (*ST*, *LT*, *ial*, *eagg*, *eae*, *stx1* and *stx2*) markers; and phylogenetic classification into groups A, B1, B2 and D. Serotyping of isolates with serotype O157 H7 was carried out. Antimicrobial sensitivity was conducted according to international standards. It was researched the following genes in resistant strains: *blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA*, CMY, CTX-M, *tetA*, *tetB*, *aadA*, *aphA*, *strAB*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *qnrA*, *qnrD*, *qnrB*, *qnrS*, *oqxAB*, *aac*, *qnrC* and *qepA* and markers to the plasmids Inc group K/B, W, FIIA, FIA, FIB, Y, I1, F, X, HI1, N, H12 and L/M. There was no *Salmonella* spp. in animals studied. Twenty-seven *E. coli* strains were isolated from nine out of the 94 evaluated animals (10%). Combinations of 4 AVP genes (*ironN*, *ompT*, *iss* e *hlyF*) were detected in two strains (2/27-7%); and *iss* (1/27-4%) was detected once. From the 27 isolations, six (22%) were classified as phylogenetic group A; 18 (67%) as B1, three (11%) as B2 and none as D. There was no agglutination with O157 H7 antiserum. The highest resistance rates were observed to amoxicillin (22/27-82%), ampicillin (21/27-79%), streptomycin (18/27-67%) and tetracycline (11/27-40.7%). Sixteen isolates (59%) of seven different animals showed multidrug resistance. Resistance genes *strAB*, *blaTEM*, *tetA*, *tetB*, *aadA*, *aphA*, *sul1*, *sul2* and *sul3* were detected. Resistance plasmids were verified in 20 strains, IncFIB (18/27), IncFIA (3/27), IncY (2/27) and IncI1 (4/27). Despite the low percentage of strains with zoonotic potential originating in healthy captive cockatiels, antimicrobial resistance and multidrug resistance were significant features. The role of pets in the perpetuation and dissemination of resistant bacteria is relevant in Public

Health. Our findings emphasize the importance of proper sanitary habits between owners and their pet birds, as well as a strict regulation over the use of antimicrobials in animals.

Key-words: antimicrobial sensitivity; APEC; Cockatiel; *Escherichia coli*; *Nymphicus hollandicus*; *Salmonella* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição dos patotipos de <i>Escherichia coli</i>	19
Figura 2- Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético de cepas de <i>E. coli</i> , utilizando os resultados da amplificação dos genes <i>chuA</i> e <i>yjaA</i> e do fragmento de DNA TSPE4.C2.....	29
Figura 3- Relação entre grupos filogenéticos de <i>E.coli</i> e a origem das calopsitas: Pet shop (N=3), Domicílio (N=9) e Criatório (N=15)	34
Figura 4- Resistência de <i>E. coli</i> isoladas de calopsitas em relação às classes de antibacterianos testadas	35
Figura 5- Resistência de <i>E. coli</i> isoladas de calopsitas em relação às drogas antibacterianas testadas	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolamento de *E. coli* em calopsitas de acordo com a origem das aves.....32

Tabela 2 - Cepas de *E. coli* isoladas de calopsitas saudáveis, grupos filogenéticos, genótipo de virulência, fenótipo e genótipo de resistência a antimicrobianos33

LISTA DE ANEXOS

Anexo a- Certificado do Comitê de Ética na Utilização de Animais.....	53
Anexo b- Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos.....	54
Anexo c- Questionário sobre manejo e histórico de saúde das calopsitas e humanos contactantes	55
Anexo d- Sequência dos iniciadores e tamanho dos amplificados para a pesquisa de marcadores de virulência e grupos filogenéticos de <i>E.coli</i> isoladas de calopsitas	57
Anexo e- Sequência dos iniciadores e tamanho dos amplificados para a pesquisa de marcadores de resistência antimicrobiana de <i>E. coli</i> isoladas de calopsitas.....	59
Anexo f- Sequência dos iniciadores e tamanho dos amplificados para a pesquisa de marcadores de grupos Inc de plasmídeos de <i>E. coli</i> isoladas de calopsitas.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMO: amoxicilina
AMP: ampicilina
APEC: *Escherichia coli* patogênica para aves
CEP: Comitê de ética em pesquisa
CEUA: Comitê de ética na Utilização de Animais
CFE: cefalexina
CFO: cefoxitina
CIP: ciprofloxacina
CLO: cloranfenicol
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CTF: ceftiofur
DAEC: *Escherichia coli* difusamente aderente
DEC: *Escherichia coli* diarreiogênica
E. coli: *Escherichia coli*
EAEC: *Escherichia coli* enteroaggregativa
EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva
ENO: enrofloxacina
EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica
ESBLs: β-lactamases de espectro estendido
EST: estreptomicina
ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica
ExPEC: *Escherichia coli* extraintestinal
GEN: gentamicina
Inc: Incompatibilidade
IPM: imipenem
NAL: ácido nalidíxico

NIT: nitrofurantoína

NMEC: *Escherichia coli* causadora de meningite neonatal

PCR: *Polimerase chain reaction*

STEC: *Escherichia coli* produtora de toxina de shiga

SUT: cotrimoxazol

TET: tetraciclina

UPEC: *Escherichia coli* uropatogênica

LISTA DE SÍMBOLOS

%: porcentagem

h: hora

mL: mililitro

N: número

μ g: micrograma

UV: ultravioleta

V: volts

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2 INTRODUÇÃO.....	24
3 OBJETIVOS	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 População de estudo e colheita de amostras clínicas	27
4.2 Processamento das amostras clínicas	27
4.2.1 Isolamento e identificação fenotípica de <i>E. coli</i>	27
4.2.2 Isolamento e identificação fenotípica de <i>Salmonella</i> spp.	27
4.3 Manutenção dos isolados.....	28
4.4 Caracterização molecular dos fatores de virulência de <i>E. coli</i>	28
4.5 Classificação dos isolados de acordo com os grupos filogenéticos	29
4.6 Sorotipagem dos isolados	29
4.7 Sensibilidade aos antimicrobianos	30
4.8 Pesquisa de genes de resistência antimicrobiana.....	30
4.9 Caracterização genotípica dos plasmídeos de resistência antimicrobiana	30
4.10 Análise estatística	31
5 RESULTADOS.....	32
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXOS	53

1. REVISÃO DE LITERATURA

As aves representam a maioria das espécies silvestres mantidas como animais de companhia (*pet*) em nosso meio, sendo grande parte proveniente do tráfico (FOTIN, 2005). As principais espécies mantidas em cativeiro domiciliar são pertencentes às ordens Psittaciformes e Passeriformes (CUBAS e GODOY, 2007). O termo psitacídeo é aceito e amplamente usado para designar qualquer uma das espécies que pertençam à ordem Psittaciformes (CUBAS e GODOY, 2007; HARCOURT-BROWN, 2010) e engloba os papagaios, araras, cacatuas, periquitos, calopsitas e lóris (HARCOURT-BROWN, 2010).

No final do século XIX, a calopsita (*Nymphicus hollandicus*) já era uma ave de companhia popular e assim permaneceu desde então (HARCOURT-BROWN, 2010). As calopsitas se destacam no comércio *pet* em decorrência do baixo custo de aquisição e manutenção, bem como por sua beleza, docilidade, comportamento ativo, canto, e grande capacidade de interação com o ser humano (GRESPLAN, 2009; HARCOURT-BROWN, 2010). Entretanto, devido ao estreito relacionamento comumente presente entre o proprietário e o animal, torna-se alto o risco da ocorrência de doenças relacionadas a patógenos capazes de infectar diferentes hospedeiros (GRESPLAN, 2009; TOMPKINS et al., 2011)

Dentre as bactérias com potencial zoonótico, destacam-se *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (CARVALHO, 2006). Ambas são pertencentes à família Enterobacteriaceae, são bastonetes Gram-negativos, não esporulados e anaeróbios facultativos (HIRSH, 2003). Em termos de morbidade e letalidade, essas bactérias têm um grande impacto na saúde pública, com um custo econômico de vários bilhões de dólares anualmente (RUSSO e JOHNSON, 2003).

Salmonella spp. habita o trato gastrointestinal de uma grande variedade de animais vertebrados, ocorrendo frequentemente em aves (HIRSH, 2003). É considerada um dos microrganismos mais amplamente distribuídos na natureza, sendo os animais, incluindo o homem, seus principais reservatórios naturais (SHINOHARA et al., 2008). São conhecidos mais de 2500 sorotipos de *Salmonella* spp, dos quais 1531 pertencem à subespécie *enterica*, sendo a maioria patogênica aos seres humanos (GRIMONT e WEILL, 2007). Sua transmissão se dá pela via orofecal, podendo ser transmitida por solo, água, alimentos contaminados, vegetação, poeira e aerossóis (GAST, 2003). Insetos, artrópodes, roedores e outros animais

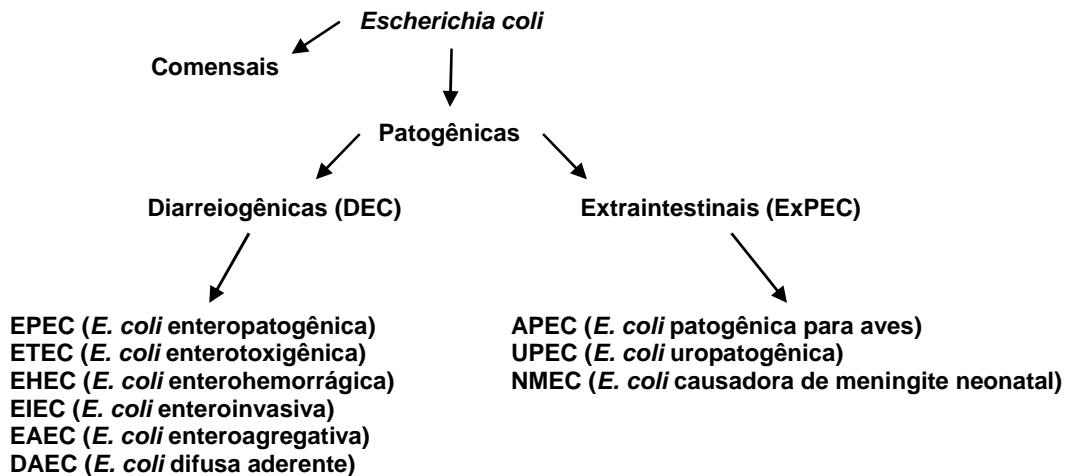
sinantrópicos também desempenham papel importante no carreamento da bactéria (ALLGAYER et al., 2009; GAST, 2003).

Os sinais clínicos são muito variados, incluindo diarreia, emese, hipo ou hipertermia, artrite, panoftalmia, podendo evoluir para septicemia e óbito. Também pode ocorrer infecção assintomática (KANASHIRO et al., 2002; SONCINI, 2002). Fatores ligados ao agente, como a patogenicidade do sorotipo e sua carga infectante, associados às características do hospedeiro, como idade, imunocomprometimento, e as condições de manejo (superlotação, estresse, condições ambientais e nutricionais) são determinantes para o estabelecimento ou não da doença clínica (CORRÊA et al., 2013; KANASHIRO et al., 2002). Aves que sobrevivem a um surto de salmonelose podem tornar-se portadoras assintomáticas (ALLGAYER et al., 2008; KANASHIRO et al., 2002). KANASHIRO e colaboradores (2002) relataram a presença de *Salmonella* spp. em aves assintomáticas de um criadouro comercial de psitacídeos, após a ocorrência de um surto no local. Salienta-se que as aves assintomáticas não possuíam qualquer contato com as aves doentes, demonstrando a dificuldade encontrada no controle da disseminação do agente.

Escherichia coli é uma bactéria comensal do microbioma intestinal de animais homeotérmicos. No entanto, cepas patogênicas são capazes de causar doenças intestinais e extraintestinais em seres humanos, mamíferos e aves, resultando em sérios prejuízos econômicos e de saúde pública (BÉLANGER et al., 2011; CROXEN e FINLAY, 2010; KAPER et al., 2004).

Escherichia coli capazes de ocasionar doença intestinal são genericamente denominadas de DEC (*Diarrheagenic Escherichia coli* – *E. coli* diarréogênica), e podem ser divididas em patotipos, os quais são geralmente definidos por marcadores de virulência e fenótipos de interação com as células epiteliais intestinais (figura 1) (KAPER et al., 2004; RUSSO e JOHNSON, 2000). Dentre elas, a *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) sorotipo O157 H7, a qual apresenta importantes fatores de virulência denominados de toxinas de Shiga (*stx1* e *stx2*), é responsável pela colite hemorrágica e síndrome urêmica hemorrágica, doenças, muitas vezes, fatais ao ser humano (NATARO e KAPER, 1998).

Figura 1 - Distribuição dos patotipos de *Escherichia coli*



Fonte: adaptado de CUNHA et al., 2013.

Escherichia coli capazes de ocasionar doenças extraintestinais são denominadas ExPEC – *Extraintestinal Pathogenic E. coli* (CROXEN e FINLAY, 2010; CUNHA et al., 2013; RUSSO e JOHNSON, 2000), sendo importantes em infecções no trato urinário, meningites neonatais, pneumonias e septicemias no homem (Figura 1) (BÉLANGER et al., 2011; MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007; RUSSO e JOHNSON, 2003), além de ocasionarem doenças em animais de estimação (SMITH et al., 2007), produção (FERREIRA e KNÖBL, 2009) e selvagens (CARVALHO et al., 2012; CARVALLO et al., 2010). *Escherichia coli* está entre as primeiras bactérias a compor o microbioma intestinal das aves. Este evento ocorre através de penetração pela casca do ovo e, logo após o nascimento, contato com a mãe e meio ambiente (ANDREATTI FILHO, 2006; CARVALHO, 2006; FERREIRA e KNOBL, 2009). Essa colonização inicial é desejável, pois além da bactéria auxiliar na digestão, síntese e absorção de alguns nutrientes, exerce ainda um efeito protetor, ocupando sítios de ligação e impedindo a colonização por bactérias patogênicas (FERREIRA e KNOBL, 2009). Mesmo cepas enteropatogênicas originadas de mamíferos raramente são relacionadas a doenças entéricas em aves (ANDREATTI FILHO, 2006).

Nas aves, APEC (*avian pathogenic E. coli*), patótipo caracterizado como ExPEC, ocasiona a colibacilose, considerada uma das principais doenças da avicultura industrial e ornamental moderna, causando grandes prejuízos econômicos no Brasil e no mundo (BENEZ, 2004). APEC pode compor o microbioma intestinal de

aves sadias, ser eliminada pela via fecal e contaminar alimentos e água, facilitando a disseminação da bactéria para outras aves (EWERS et al., 2007)

A colibacilose aviária pode ser doença localizada ou sistêmica, sendo associada a uma variedade de síndromes em aves de produção e de vida livre (FERREIRA e KNOBL, 2009). *Escherichia coli* pode ser encontrada nesses processos atuando como agente primário ou secundário (ANDREATTI FILHO, 2006), estando, muitas vezes, associada a outros microrganismos, como protozoários e bactérias, e causando infecções em aves imunocomprometidas (GODOY, 2006).

Em aves jovens, a infecção por *E. coli* ocorre principalmente por via oral, enquanto em aves mais velhas por via respiratória. Diversos fatores podem comprometer a integridade da mucosa traqueal, diminuindo a atividade ciliar, aumentando a produção de muco e afetando a atividade normal dos macrófagos, o que propicia a permanência e adesão das bactérias nestes locais, desencadeando um processo infeccioso (ANDREATTI FILHO, 2006).

Após a colonização dos pulmões e sacos aéreos, a bactéria penetra na corrente sanguínea. Cepas de baixa patogenicidade são fagocitadas e eliminadas, porém cepas que apresentem resistência à atividade bactericida dos macrófagos sobrevivem e atingem órgãos como fígado, coração e baço (ANDREATTI FILHO, 2006; CARVALHO, 2006). Além disso, devido à anatomia do sistema respiratório das aves, há grande contato entre os sacos aéreos (conectados ao pulmão) e os órgãos celomáticos (ANDREATTI FILHO, 2006), facilitando o desenvolvimento de infecções generalizadas (coliseppticemia), como pericardites, polisserosites, artrites, perihepatites, salpingites e peritonites (ANDREATTI FILHO, 2006; CARVALHO, 2006; FERREIRA e KNOBL, 2009).

Em geral, os sinais clínicos apresentados na colibacilose aviária são inespecíficos ou relacionados ao sistema acometido. Podem estar presentes letargia, penas arrepiadas ou empenamento deficiente, anorexia, poliúria, conjuntivite, rinite, dispneia, espirros, aumento de volume articular, edema subcutâneo, perda de peso, emese, onfalite, caquexia, diarreia e morte súbita (ANDREATTI FILHO, 2006; GODOY, 2006).

A presença de diarreia nos quadros de colibacilose é, em sua maioria, consequência de lesões hepáticas e renais (BENEZ, 2004). Porém, algumas cepas de *E. coli* podem destruir diretamente o epitélio intestinal, desenvolvendo uma enterite

pseudomembranosa ou ulcerativa; nesses casos, poderão estar presentes sinais de doença entérica ou até mesmo ocorrer a morte súbita da ave (GODOY, 2006).

Estudos genômicos são uma ferramenta para identificação da presença ou não de determinados fatores de virulência. A presença ou ausência deles permite a classificação do patógeno em distintos patotipos (CUNHA et al., 2013).

No que se refere ao patotipo das ExPEC, são comumente estudados os fatores de virulência relacionados à adesão, produção de toxinas, sistemas de aquisição de ferro, proteínas de resistência ao soro, evasinas, invasinas e proteínas capsulares (CUNHA et al., 2013; PITOUT, 2012; SMITH et al., 2007)

São cinco os genes que codificam fatores de virulência relacionados a cepas APEC de alta patogenicidade (JOHNSON et al., 2008). Os genes *iroN* e *iutA* são responsáveis pela codificação dos sideróforos salmochelina e aerobactina, respectivamente, facilitando a aquisição de ferro em condições adversas, fator essencial para o crescimento bacteriano (JOHNSON et al., 2008). O gene *ompT* codifica uma evasina que auxilia a bactéria a resistir à ação do complemento (NOLAN et al., 2003). O gene *hlyF* é responsável pela produção de uma hemolisina aviária (JOHNSON et al., 2008; NOLAN et al., 2003); e por fim, o gene *iss* confere à bactéria resistência às propriedades líticas do soro, sendo fundamental na patogenia das infecções causadas por APEC e outras ExPEC (JOHNSON et al., 2008; NOLAN et al., 2003; EWERS et al., 2007).

Somente a detecção do gene *iss* não caracteriza por si só a cepa como patogênica, entretanto este gene é considerado um marcador de virulência, tendo em vista sua alta prevalência em cepas isoladas de aves doentes (JOHNSON et al., 2008). O encontro deste gene tem sido relatado tanto em aves assintomáticas, numa frequência de 27% (IKUNO et al., 2008), como doentes, em porcentagens que chegam a 84% (EWERS et al., 2007; KNÖBL et al., 2008; SAIDENBERG et al., 2012).

Johnson e colaboradores (2007) demonstraram grande proximidade entre ExPEC humanas e aviárias, observando a ocorrência de sorogrupos de APEC e de UPEC que apresentavam 95,5% de similaridade no genoma. Dessa maneira, cepas humanas e aviárias têm potencial de causar infecções cruzadas, reforçando seu potencial zoonótico (MOULIN-SCHOULER et al., 2007; EWERS et al., 2007).

Estudos filogenéticos classificam *E. coli* em quatro grupos: A, B1, B2 e D. Tem-se observado que ExPEC pertencem principalmente ao grupo B2 e em menor proporção ao grupo D, sendo descritas com grande variedade de fatores de virulência;

já isolados comensais se encontram, preferencialmente, nos grupos A e B1 (CLERMONT et al., 2000; PITOUT, 2012; SMITH et al., 2007). Cepas diarreogênicas não possuem um grupo filogenético comum, ficando seu estudo restrito à presença ou não de seus fatores de virulência.

Também tem sido foco de estudos o crescente aumento da resistência antimicrobiana nestes microrganismos, pois o processo evolutivo das *E. coli* e sua plasticidade genética favorecem a aquisição de genes de resistência aos antibióticos (CUNHA et al., 2013; PITOUT, 2012) e com o uso intensivo destes nas criações animais, como promotores de crescimento ou ainda no tratamento de doenças, é crescente a pressão de seleção de bactérias resistentes a algumas classes de antibacterianos, normalmente utilizados para tratamento de infecções humanas (PITOUT, 2012).

É possível que infecções humanas do trato urinário causadas por cepas UPEC resistentes, tenham se desenvolvido a partir de cepas animais, isso porque ExPEC com padrões de resistência a antimicrobianos similares foram isoladas de infecções extraintestinais em humanos e animais (RAMCHANDANI et al., 2005), incluindo cepas de *E. coli* com alta similaridade isoladas de sangue e processos de meningite em humanos e frangos com colibacilose (MOULIN-SCHOULEUR et al., 2007).

A resistência de cepas do gênero *Salmonella* também vem crescendo com o passar dos anos (FERNANDES et al., 2009; GUERRANT et al., 2001). Ampicilina, cloranfenicol e sulfametoxazol associado ao trimetoprim foram drogas utilizadas durante muitos anos para o tratamento de salmoneloses em humanos (SANTOS et al., 2000). Porém, com o aumento da resistência a essas drogas, foram empregadas as quinolonas (HAMIDIAN et al., 2011) e, posteriormente as cefalosporinas (GUERRANT et al., 2001); entretanto, também já foram descritas cepas resistentes a estes últimos antibacterianos (FERNANDES et al., 2009).

É frequente que múltiplos determinantes genéticos, conferindo resistência a diversas classes de antimicrobianos, estejam presentes no mesmo plasmídeo, conferindo uma vantagem seletiva para a bactéria (CARATTOLI, 2013; NORDSTROM, 2005). Os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossômicas capazes de replicação autônoma e podem conferir resistência às principais classes de agentes antimicrobianos, incluindo β-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclínas, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim, macrolídeos e quinolonas (CARATTOLI, 2009). Plasmídeos bacterianos ocorrem naturalmente e são extremamente diversos,

codificam uma grande variedade de fatores, propiciando uma maior adaptação ambiental à bactéria (JOHNSON et al., 2007).

Plasmídeos carreadores de múltipla resistência a drogas são geralmente grandes, autoconjugativos e codificam mecanismos que regulam sua replicação (CARATTOLI, 2013; NORDSTROM, 2005). A porção do plasmídeo que regula a replicação é chamada de replicon e se dois plasmídeos compartilham este mesmo replicon, não são propagados para as células filhas de mesma linhagem. Esse fenômeno é conhecido como plasmídeo de incompatibilidade e é utilizado para classificar tais plasmídeos em grupos homogêneos (grupos Inc) (CARATTOLI, 2013). Identificar os plasmídeos em bactérias presentes no microbioma de humanos e animais auxilia no entendimento de sua distribuição na natureza e sua relação com as células hospedeiras, sendo assim possível descobrir suas origens evolutivas (FRANCIA et al., 2004)

Após a instalação, enterobactérias resistentes podem colonizar ou transferir seus genes plasmidiais e de resistência para os organismos do microbioma humano, durante o percurso pelo trato gastrointestinal. Genes de resistência antimicrobiana podem ser recombinados entre cepas presentes no microbioma humano e animal, possibilitando o aparecimento de amostras resistentes a inúmeras drogas (HAMMERUM e HEUER, 2009; PITOUT, 2012). Apesar da existência de cepas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos no sistema gastrointestinal não representar necessariamente um perigo à saúde humana, podem originar infecções com opções limitadas de tratamento (HAMMERUM e HEUER, 2009; PITOUT, 2012).

2. INTRODUÇÃO

Embora a manutenção de animais de companhia seja associada a benefícios físicos e emocionais, devido à influência positiva na qualidade de vida das pessoas (SPENCER, 1992), a manutenção de aves como animais de estimação pode se constituir em fator de risco à saúde pública (GRESPLAN, 2009). O relacionamento entre o homem e os animais leva à ocorrência e transmissão de várias doenças, devido à capacidade dos patógenos parasitarem diferentes hospedeiros (TOMPKINS et al., 2011). Dessa maneira, as calopsitas, devido ao contato estreito que seus proprietários mantêm com elas, podem albergar e transmitir agentes de doenças infecciosas aos seres humanos (GRESPLAN, 2009).

A salmonelose, causada por bactérias do gênero *Salmonella*, é uma doença aviária de grande importância devido a sua alta letalidade e potencial zoonótico (KANASHIRO et al., 2002; SONCINI, 2002). As aves infectadas são consideradas o veículo mais comum para a ocorrência de salmonelose humana, sendo a contaminação de sua carne/ovos uma das principais causas de infecção alimentar em todo o mundo (GAST, 2003; SONCINI, 2002).

Escherichia coli é uma bactéria comensal do microbioma intestinal de animais homeotérmicos. No entanto, cepas patogênicas são capazes de causar doenças intestinais e extraintestinais em seres humanos, mamíferos e aves, resultando em sérios prejuízos econômicos e de saúde publica (BÉLANGER et al., 2011; CROXEN e FINLAY, 2010; KAPER et al., 2004; KONEMAN et al., 2001). Estudos com cepas causadoras de septicemia em humanos e aves demonstraram que o genoma pode apresentar grande variedade devido à presença de plasmídeos, fagos e elementos transponíveis, sendo comum a ocorrência destes em tanto em *E.coli* quanto em *Salmonella* spp. (MOKADY e URI-GOPHNA RON, 2005), e fatores de virulência semelhantes em cepas isoladas em humanos e APEC são comumente descritos (BÉLANGER et al., 2011; SMITH et al., 2007)

Além do potencial zoonótico de ambas as bactérias, é crescente a preocupação relativa ao aumento de sua resistência antimicrobiana (CUNHA et al., 2013). Essa expansão da resistência deve-se à seleção e também à transferência horizontal de genes por meio de plasmídeos, que colaboram com a variabilidade genética da bactéria por serem elementos genômicos móveis (JOHSON et al., 2007). Enterobactérias resistentes a antimicrobianos ou genes de resistência podem ser

adquiridos por humanos a partir de animais, seja por contato direto, via alimentar ou meio ambiente. (HAMMERUM e HEUER, 2009).

Uma vez que as aves podem ser reservatório de agentes patogênicos e zoonóticos, o conhecimento do microbioma intestinal daquelas mantidas como *pets* estrutura o perfil epidemiológico da relação parasita/hospedeiro, servindo como um parâmetro de normalidade na caracterização de processos patogênicos. Além disso, o uso inadequado de antimicrobianos resultou numa pressão seletiva, com o surgimento de cepas bacterianas multirresistentes, tornando necessário o conhecimento do perfil de sensibilidade das bactérias constituintes do microbioma desses animais. Pouca informação, entretanto, encontra-se disponível sobre o papel epidemiológico das aves mantidas como animais de estimação, na epidemiologia das *E. coli* e *Salmonella* spp e seus perfis de sensibilidade/resistência aos antibacterianos.

3. OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivo pesquisar a presença de *E. coli* e *Salmonella* spp., como agentes de potencial zoonótico, em mucosa cloacal de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) saudáveis mantidas em cativeiro, determinando a sensibilidade/resistência das bactérias isoladas a drogas antibacterianas.

Além disso, pesquisar nos isolados de *E. coli* genes de virulência relacionados com os grupos DEC, ExPEC e APEC, realizar sorotipagem para o sorotipo O157 H7 e classificá-los em relação aos grupos filogenéticos.

Foram ainda pesquisados genes relacionados à resistência às principais classes de antimicrobianos: β -lactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, quinolonas e sulfonamidas e, os marcadores de plasmídeos de resistência de grupo Inc.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. População de estudo e colheita de amostras clínicas

Foram colhidas amostras clínicas de 94 calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) clinicamente saudáveis, mantidas em cativeiro, de ambos os sexos (protocolo CEUA 237/14, anexo a). Oito foram provenientes de um *pet shop*, 28 de oito domicílios e 58 de dois criatórios comerciais localizados nas cidades de São Paulo/SP e Niterói/RJ.

A contenção dos animais foi realizada fisicamente e, após antisepsia da região pericloacal com solução alcoólica 70% e gaze estéril, foram friccionados dois *swabs* uretrais contra a mucosa cloacal, sendo mantidos em meio de Stuart sob refrigeração, e enviados ao Laboratório de Biologia Molecular e Celular da UNIP em até 48 horas.

Previamente à colheita de material, todos os 11 proprietários, sendo um de *pet shop*, dois de criadores comerciais e oito de aves de estimação mantidas em ambiente domiciliar, responderam a um questionário para levantamento do histórico da saúde das aves e de humanos contactantes (Parecer CEP 1.024.542, Anexos b e c).

4.2. Processamento das amostras clínicas

4.2.1. Isolamento e identificação fenotípica de *E. coli*

Para a pesquisa de *E. coli* um *swab* cloacal foi semeado em ágar MacConkey (DifcoTM), sendo a identificação das cepas isoladas realizada de acordo com as técnicas rotineiras de identificação bioquímica (KONEMAN et al., 2001), incluindo os *kits* de identificação EPM, MILi, Citrato (ProbacTM).

4.2.2. Isolamento e identificação fenotípica de *Salmonella* spp.

O *swab* para pesquisa de *Salmonella* spp. foi inoculado e semeado de acordo com o proposto por Michael e colaboradores (2003).

4.3. Manutenção dos isolados

Três isolados de *E. coli* de cada animal foram mantidos em meio de Lignieres¹ e congelados em duplicata em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI -MerckTM) acrescido de glicerol a 80% (InvitrogenTM) na proporção de 1:1, mantidos em biofreezer a -80°C para as análises subsequentes.

4.4. Caracterização molecular dos fatores de virulência de *E. coli*

Os isolados de *E. coli* foram submetidos à reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para pesquisa de genes que caracterizam cepas patogênicas extraintestinais (ExPEC), sendo acessados os genes *papC*, *papEF*, *sfa*, *iucD*, *fyuA*, *cnf1*, *hly*, *cvaC* e *malX* (JOHNSON e STELL, 2000; LE BOUGUENEC et al., 1992; POLLARD et al., 1990), além de cinco genes preditores de virulência para aves, *ironN*, *ompT*, *hlyF*, *iss* e *iutA* (JOHNSON et al., 2008). Foram pesquisados também os seguintes genes relacionados a amostras diarreogênicas: *stx1*, *stx2* e *eae* (GANNON et al., 1993; OLSVIK et al., 1991), no intuito de caracterizar amostras de EHEC. As sequências dos iniciadores e o tamanho dos amplificados de cada um dos genes encontram-se no Anexo d. Todos os isolados de *E. coli* foram encaminhados ao laboratório de referência nacional para enteroinfecções bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) para a pesquisa dos seguintes genes relacionados a amostras diarreogênicas: *ST*, *LT*, *ial* e *eagg*.

Para confirmação da amplificação pela PCR, foi realizada eletroforese das amostras em gel de agarose a 1% em tampão TBE², colocando-se em ambas as extremidades do gel marcador de peso molecular de 100 pb (Novergen). A corrida foi realizada a 100V por 1h, sendo na sequência, o produto corado em brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizado em transiluminador UV e registrado em fotodocumentador (Kodak, *Gel Logic 212 Imaging System*).

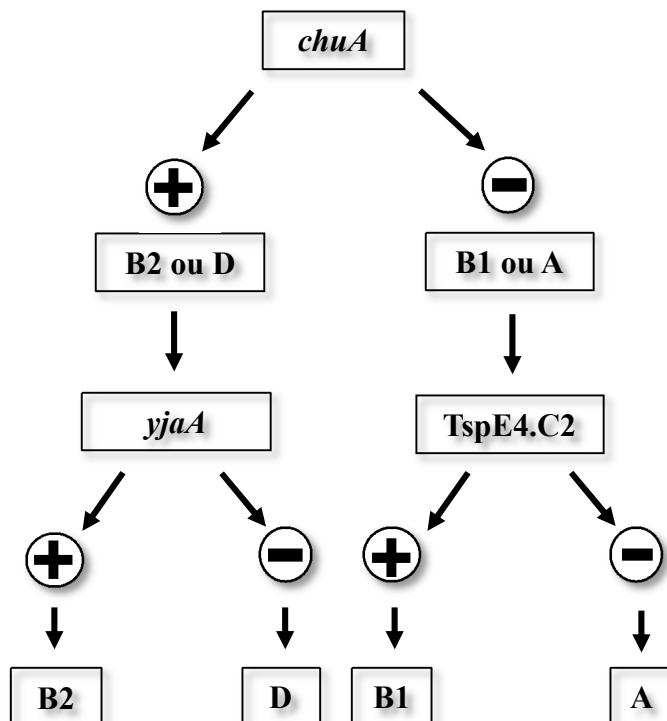
¹ Extrato de carne (5g), Peptona (10g), NaCl (5g), Gelatina (5g), Agar (7g) e água destilada (1000mL)

² 10,8g de Tris Base (Bio Basic IncTM), 5,5g de ácido bórico (Carlo ErbaTM), 4mLde EDTA (0,5M pH 8,0) (Bio Basic IncTM) e 100mL de água mili-Q.

4.5. Classificação dos Isolados de acordo com os grupos filogenéticos

A pesquisa dos genes selecionados para a análise filogenética foi realizada utilizando-se a técnica de PCR e os resultados obtidos foram classificados de acordo com a árvore proposta por Clermont e colaboradores (2000) (Figura 2). No Anexo d encontra-se a sequência dos iniciadores e o tamanho dos amplificados.

Figura 2 - Árvore dicotômica para determinar o grupo filogenético de cepas de *E. coli*, utilizando os resultados da amplificação dos genes *chuA* e *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4.C2



Fonte: Adaptado de CLERMONT et al., 2000.

4.6. Sorotipagem dos isolados

Todos os isolados de *E. coli* foram encaminhados para sorotipagem, por meio de testes de aglutinação, utilizando-se os antissoros O157 e H7, de acordo com técnicas sorológicas padronizadas internacionalmente, no laboratório de referência nacional para enteroinfecções bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ).

4.7. Sensibilidade aos antimicrobianos

A sensibilidade às drogas foi verificada por meio da realização de testes de difusão em placas, segundo padrões determinados internacionalmente (CLSI, 2013). As drogas (CefarTM) utilizadas pertenceram às seguintes classes de antibacterianos: β-lactâmicos penicilinas (amoxicilina - AMO e ampicilina - AMP), β-lactâmicos cefalosporinas (cefalexina - CFE, cefoxitina - CFO e ceftiofur - CTF) e β-lactâmicos tienamicinas (imipenem - IPM); aminoglicosídeos (estreptomicina - EST e gentamicina - GEN); tetraciclinas (tetraciclina - TET); quinolonas (ciprofloxacina - CIP, enrofloxacina - ENO e ácido nalidíxico - NAL); nitrofuranos (nitrofurantoína - NIT); sulfonamidas (cotrimoxazol - SUT); anfenicóis (cloranfenicol - CLO). Considerou-se cepa multirresistente, quando ocorreu resistência a três ou mais classes de antibacterianos (SMITH et al., 2007).

4.8. Pesquisa de genes de resistência antimicrobiana

As cepas de *E. coli* que apresentaram fenótipo de resistência antimicrobiana foram submetidas à reação de PCR para pesquisa de genes de resistência à classe de antibacteriano apresentada.

Para a classe dos β-lactâmicos foram pesquisados os genes *blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA*, *blaCMY* e *blaCTX-M* (DALLENNÉ et al., 2010). Para as tetraciclinas foram acessados em multiplex os genes *tetA* e *tetB*. Para os aminoglicosídeos os genes *aadA*, *aphA* e *strAB*. Os genes *sul1*, *sul2* e *sul3* foram acessados nas cepas resistentes às sulfonamidas (SAENZ et al., 2004). E por fim, para a pesquisa de genes de resistência às quinolonas foram acessados por multiplex os genes *qnrA*, *qnrD*, *qnrB*, *qnrS*, *oqxAB*, *aac*, *qnrC* e *qepA* (CIESIELCZUK et al., 2013). As sequências dos iniciadores e o tamanho dos amplificados de cada um dos genes/marcadores encontram-se no Anexo e.

Para a análise dos resultados da PCR, a corrida eletroforética foi realizada durante 1h30min, conforme descrito no item 4.4.

4.9. Caracterização genotípica dos plasmídeos de resistência antimicrobiana.

Todos os isolados de *E. coli* foram submetidos à reação de PCR para pesquisa de marcadores que caracterizam a presença de diferentes plasmídeos que carreiam resistência antimicrobiana. Foram acessados em protocolo proposto por Johnson e

Nolan (2009), os marcadores para os plasmídeos de grupo Inc K/B, W, FIIA, FIA, FIB, Y, I1, F, X, HI1, N, H12 e L/M (Anexo f).

Para a análise dos resultados da PCR a corrida de eletroforese ocorreu como descrito anteriormente.

4.10. Análise estatística

Realizou-se teste de qui-quadrado com $p \leq 0,05$, a fim de se comparar a frequência de *E. coli* em relação ao ambiente onde o animal vivia (domicílio, *pet shop*, criatório) (GLANTZ, 2013).

5. RESULTADOS

Não houve isolamento de *Salmonella* spp. nas amostras.

A frequência de *E. coli* nos animais avaliados foi de 10% (9/94). Destes, um era proveniente de *pet shop* (1/8-13%), três de domicílios (3/28-11%) e cinco de criadores comerciais (5/58-9%), não havendo diferença estatística no isolamento da bactéria em relação à origem do animal (Tabela 1).

Tabela 1 - Isolamento de *E. coli* em calopsitas de acordo com a origem das aves, domicílio, *pet shop* e criatório.

Origem	Positivos		Negativos		Total	
	N	%	N	%	N	%
Domicílio	3	11	25	89	28	30
<i>Pet shop</i>	1	13	7	87	8	8
Criatório	5	9	53	91	58	62
Total	9	10	85	90	94	100

$\chi^2=0,18$ (não significante)

Nenhuma das cepas avaliadas apresentou aglutinação com os antissoros O157 e H7.

Os resultados dos genes preditores de fatores de virulência, grupos filogenéticos e perfil de resistência antimicrobiana estão apresentados na Tabela 2.

Observou-se que o maior número de cepas pertenceu ao grupo filogenético B1 (67% - 18/27), seguido dos grupos A (22% - 6/27) e B2 (11% - 3/27), não houve cepas pertencentes ao grupo filogenético D (Figura 3 e Tabela 2).

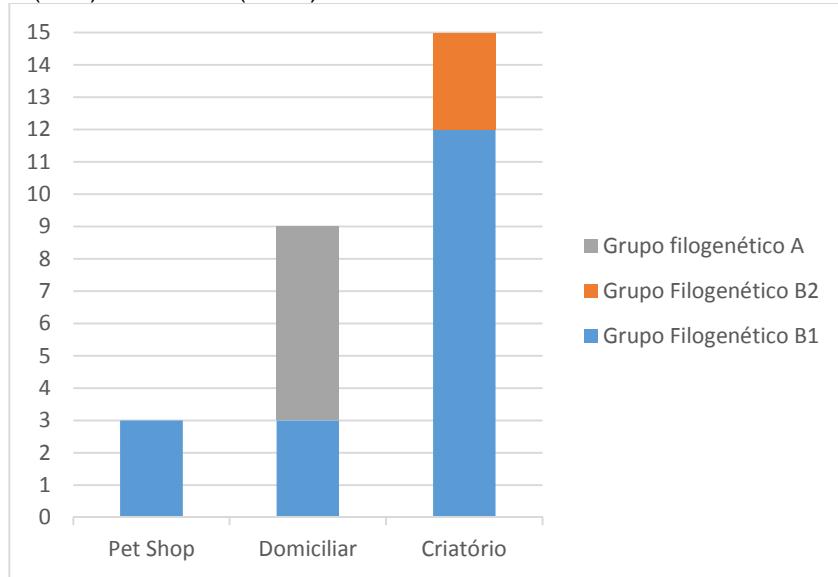
Não foram detectados genes que caracterizassem cepas de *E. coli* diarreogênicas (*stx1*, *stx2*, *ST*, *LT*, *ial*, *eagg* e *eae*). Com exceção dos genes relacionados às APEC em duas aves, não foram detectados genes às demais ExPEC (*papC*, *papEF*, *sfa*, *iucD*, *fyuA*, *cnf1*, *hly*, *cvaC*, *malX* e *iutA*) (Tabela 2).

Tabela 2 - Cepas de *E. coli* isoladas de calopsitas saudáveis, procedência das aves, grupos filogenéticos, genótipo de virulência, fenótipo e genótipo de resistência antimicrobianos.

Animal	Procedência	Cepa	Grupo Filogenético	Genótipo de virulência*	Resistência Antimicrobiana		
					Fenótipo	Genótipo**	Plasmídeos***
1	<i>Pet Shop</i>	1	B1	----	EST	<i>strAB</i>	IncFIB
		2	B1	----	CFE; EST; GEN	<i>strAB</i>	-----
		3 ^a	B1	----	AMO; CFE; CFO; EST; GEN; TET; ENO ^a	<i>strAB</i>	IncFIB
2	Domicílio	1 ^a	A	----	AMP; CTF; EST; NAL ^a	<i>strAB</i>	IncFIB; IncFIA
		2 ^a	A	----	AMP; EST; TET; CIP ^a	<i>strAB</i>	IncFIB; IncFIA; IncY
		3 ^a	A	----	CTF; EST; CIP ^a	<i>strAB</i>	IncFIB; IncFIA; IncY
3	Criador	1 ^a	B2	----	AMP; AMO; EST; TET; CLO; ENO; CIP; NAL ^a	<i>blaTEM tetB strAB</i>	IncFIB
		2 ^a	B2	----	AMP; AMO; EST; TET; CLO; ENO; CIP; NAL ^a	<i>blaTEM tetB strAB</i>	Incl1
		3 ^a	B2	----	AMP; AMO; EST; TET; CLO; ENO; NAL ^a	<i>blaTEM tetB strAB</i>	IncFIB
4	Criador	1 ^a	B1	----	AMP; AMO; EST; TET; CLO; ENO; CIP; NAL; SUT ^a	<i>blaTEM tetB aadA; aphaA sul3</i>	-----
		2 ^a	B1	----	AMP; AMO; CFE; EST; TET; CLO; ENO; CIP; NAL; SUT ^a	<i>blaTEM tetB aadA; aphaA sul3</i>	-----
		3 ^a	B1	----	AMP; AMO; CFE; EST; TET; CLO; ENO; CIP; NAL; SUT ^a	<i>blaTEM tetB aadA; aphaA sul3</i>	-----
5	Criador	1 ^a	B1	----	AMP; AMO; CFE; CTF; EST ^a	<i>blaTEM strAB</i>	IncFIB
		2	B1	----	AMP; AMO; CFE	<i>blaTEM strAB</i>	IncFIB
		3	B1	----	AMP; AMO; EST	<i>blaTEM</i>	IncFIB
6	Criador	1 ^a	B1	----	AMO; CFE; EST ^a	<i>blaTEM strAB</i>	IncFIB
		2 ^a	B1	----	AMO; IPM; EST	<i>blaTEM strAB</i>	IncFIB
		3 ^a	B1	----	AMP; AMO; IPM; EST	<i>blaTEM strAB</i>	IncFIB
7	Criador	1	B1	----	AMP; AMO	<i>blaTEM</i>	IncFIB
		2	B1	----	AMP; AMO; EST	<i>blaTEM strAB</i>	IncFIB
		3	B1	----	AMP; AMO	-	IncFIB
8	Domicílio	1 ^a	B1	----	AMP; AMO; EST; TET; SUT ^a	<i>tetB strAB; aadA sul2</i>	IncFIB; Incl1
		2 ^a	B1	ompT, hlyF e iss ironN, ompT, hlyF e iss	AMP; AMO; CFE; TET; CLO; ENO; CIP; NAL; SUT ^a	<i>tetA sul1</i>	Incl1
		3 ^a	B1	ompT, hlyF e iss ironN, ompT, hlyF e iss	AMP; AMO; EST; TET; SUT ^a	<i>tetB strAB; aadA sul2</i>	IncFIB; Incl1
9	Domicílio	1	A	<i>lss</i>	AMP; AMO; SUT	<i>sul1</i>	-----
		2	A	----	AMP; AMO; SUT	<i>sul1</i>	-----
		3	A	----	AMP; AMO; SUT	<i>sul1</i>	-----

*Todas as cepas foram negativas para *papC*, *papEF*, *sfa*, *iucD*, *fyuA*, *cnf1*, *hly*, *cvaC*, *malX*, *iutA*, *stx1*, *stx2*, *ST*, *LT*, *ial*, *eagg* e *eae*. **Todas as cepas foram negativas para *blaSHV*, *blaOXA*, *blaCTX-M*, *blaCMY*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *oqxAB*, *qepA* e *aac*. ***Todas as cepas foram negativas para K/B, W, FIIA, F, X, HI1, N, H12 e L/M. ^aCepas multirresistentes

Figura 3 - Relação entre grupos filogenéticos de *E. coli* e a origem das calopsitas: Pet shop (N=3), Domicílio (N=9) e Criatório (N=15).



Todas as cepas foram sensíveis à nitrofurantoína (Figuras 4 e 5). A maior porcentagem de resistência ocorreu frente aos β -lactâmicos (93%), sendo 89% das cepas resistentes às penicilinas, 37% às cefalosporinas e 7% às tienamicinas, seguida dos aminoglicosídeos (74%) (Figura 4). Amoxicilina e ampicilina foram os antimicrobianos com maior número de cepas resistentes, 81% (22/27) e 78% (21/27) respectivamente, seguidas de estreptomicina (74% - 20/27) (Figura 5).

Pode-se observar na Tabela 2 que 30% dos isolados (8/27) apresentaram resistência a sete ou mais das drogas antibacterianas testadas. Sessenta e sete por cento das cepas (18/27) mostraram resistência a duas ou mais classes de antibacterianos, ocorrendo multirresistência em 59% delas (16/27) (Tabela 2). O perfil de multirresistência mais observado foi a combinação de penicilinas, cefalosporinas e aminoglicosídeos (Tabela 2).

Como é possível observar na tabela 2, 96% (26/27) das cepas de *E. coli* apresentaram genes de resistência. Em relação às classes de antibacterianos, genes de resistência aos aminoglicosídeos foram verificados em 77% dos isolados, às penicilinas em 54%, às tetraciclínas e sulfonamidas em 35%, às quinolonas em 4% e nenhuma cepa apresentou gene de resistência às cefalosporinas.

Os genes mais frequentes nas cepas estudadas foram *strAB* (17/26 – 65%), que confere resistência aos aminoglicosídeos e *blaTEM* (14/26 – 54%), resistência às penicilinas. O perfil genotípico de resistência mais variado foi o *blaTEM tetB aad aphaA sul3*, presente em três cepas isoladas de um mesmo animal pertencente a um

criador comercial, o qual demonstrou a presença de cinco genes entre os 21 pesquisados e fenotipicamente resistência a dez dos antimicrobianos testados (Tabela 2).

Figura 4 - Resistência de *E. coli* isoladas de calopsitas em relação às classes de antibacterianos testadas

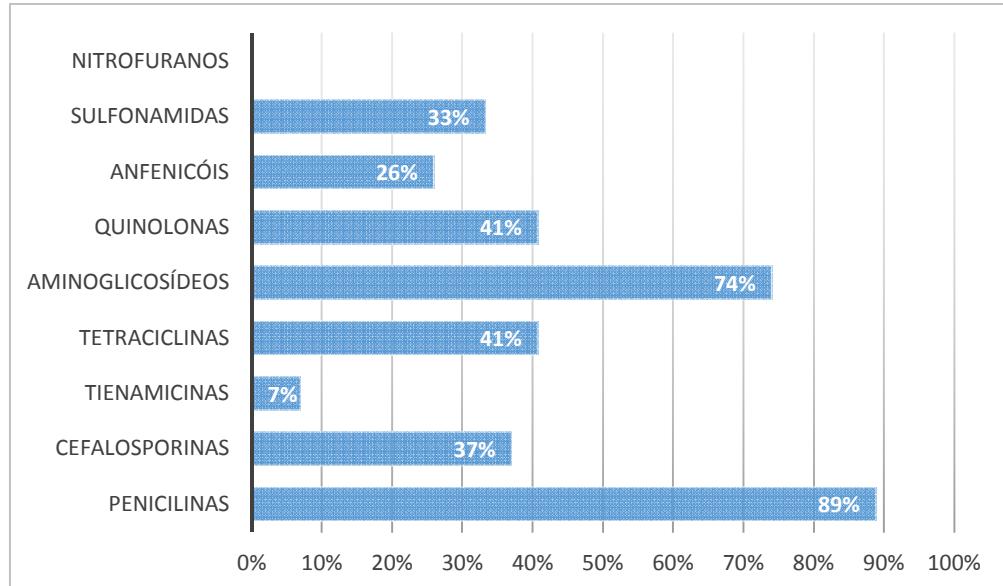
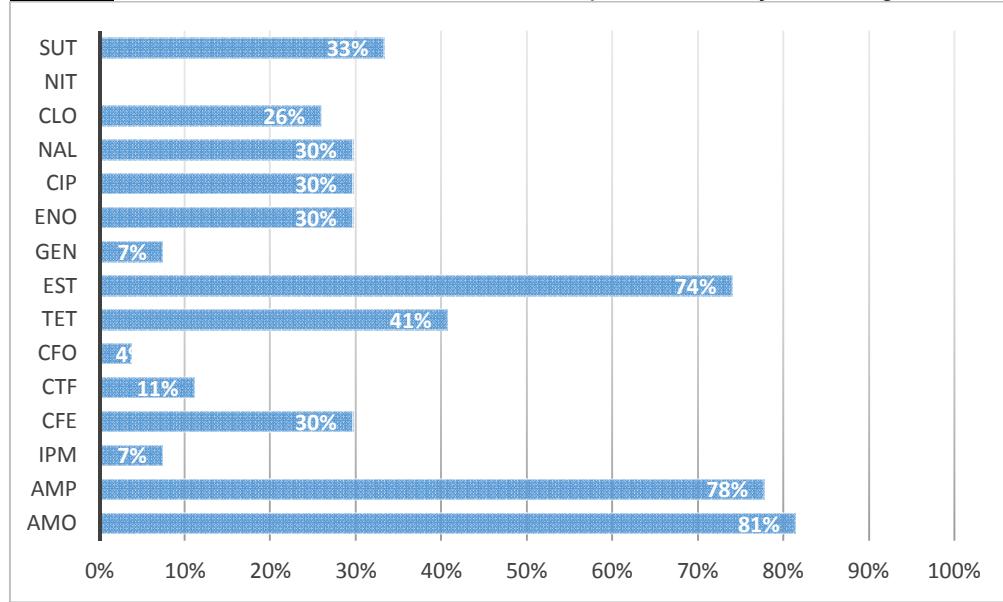


Figura 5 - Resistência de *E. coli* isoladas de calopsitas em relação às drogas antibacterianas testadas



Detectou-se plasmídeos em 74% (20/27) dos isolados de *E. coli*. O plasmídeo de maior ocorrência foi o IncFIB, presente em 67% (18/27) das cepas, seguido do IncI1 (4/27 – 15%), do IncFIA (3/27 – 11%) e IncY (2/27 – 7%). Sete cepas não

apresentaram positividade para os marcadores de grupos IgC pesquisados e cinco cepas apresentaram mais de um grupo IgC de plasmídeos (Tabela 2).

A análise dos questionários respondidos pelos proprietários permitiu observar que, das aves domiciliadas, todas tinham livre acesso aos cômodos da residência. Além disso, estes proprietários mantinham contato estreito com elas. A quase totalidade das aves do estudo (93/94) mantinha contato direto com outras aves (93/94-99%), ou cães/gatos (7/94-7%).

Não foi relatado o uso de equipamentos de proteção individual durante a limpeza das gaiolas. Esta era realizada em 73% dos casos (8/11) semanalmente e em 27% (3/11) diariamente. O uso de água e detergentes foi relatado em 27% (3/11) dos casos, de desinfetantes em 18% (2/11) e 55% (6/11) somente trocavam o substrato.

Os dois criadores relataram morte súbita em aves de seu plantel. Um dos criadores relatou surto de doença intestinal, que foi solucionado com suporte terapêutico instituído por médico veterinário. Em quatro das aves mantidas como pet em ambiente domiciliar, foram relatadas doenças prévias, três com sinais de doença intestinal (diarreia) e uma respiratória; embora todas tenham apresentado melhora dos sinais após tratamento veterinário, em nenhum dos casos foi realizado exame diagnóstico.

6. DISCUSSÃO

Os patógenos emergentes são um problema de saúde pública e uma ameaça aos animais domésticos, selvagens e para a conservação da biodiversidade global (IKUNO et al., 2008). O potencial zoonótico que as aves de companhia representam não se limita ao contato direto com elas, podendo estar associado a atividades executadas no ambiente em que elas vivem (FENGA et al., 2007). Nenhum dos proprietários, neste estudo, fazia uso de equipamentos de proteção/segurança durante a limpeza do ambiente ocupado pela ave, expondo-se a eventuais patógenos transmitidos por meio da inalação de aerossóis ou partículas de poeira dispersas no ar a partir de urina, secreções ou fezes de aves infectadas.

Todas as aves domiciliadas (28) mantinham contato direto com seus proprietários, os quais relataram brincar, beijar, segurá-las junto ao corpo. Em pesquisa sobre clamidiose em calopsitas, comprovou-se que o contato direto boca-bico, boca-pena, bicada de uma ave infectada, podem ser vias de transmissão de doenças (GRESPLAN, 2009), corroborando os riscos que as pessoas correm ao manipular sem os devidos cuidados estes animais. Além deste risco inerente ao contato estreito, cerca de um terço dos entrevistados relatou a presença no domicílio de pessoas portadoras de doenças crônicas, como *diabetes mellitus*, hipotireoidismo, hipertensão, cardiopatias, câncer, e outras não especificadas, aumentando o risco zoonótico entre proprietário e ave de estimação.

Informações sobre a epidemiologia de *Salmonella* spp. em animais selvagens e domésticos são importantes para a detecção de possíveis reservatórios do agente (ALLGAYER et al., 2009). Nesta pesquisa, não foram isoladas bactérias do gênero *Salmonella*, concluindo que as calopsitas pesquisadas não representavam risco de transmissão de salmonelose aos contactantes, homens ou outros animais; este fato também foi verificado em estudos anteriores realizados em psitacídeos (CORREA et al., 2013).

Não foram observadas diferenças estatísticas na porcentagem de isolamento de *E. coli* nas 94 calopsitas (10%) em relação à origem dos animais (domicílios, pet shops, criatórios), concluindo que as pessoas que as manipulavam corriam risco similar, independentemente do local onde eram criadas. Em um estudo com 125 psitacídeos de 12 espécies diferentes, relatou-se ocorrência de *E. coli* em 14% das aves, resultado comparável ao aqui obtido (GRAHAM e GRAHAM, 1978). Entretanto,

alguns pesquisadores têm referido porcentagens de isolamento de *E. coli* superiores. Em pesquisas com psitacídeos silvestres observou-se frequências variando de 31% (FLAMMER e DREWES, 1988) a 48% (CORRÊA et al., 2013).

A virulência bacteriana é um fenômeno multifatorial e a aquisição de fatores de virulência pode tornar uma cepa de *E. coli* comensal em patogênica (IKUNO et al., 2008). No presente estudo, das 27 cepas testadas para os genes preditores de fatores de virulência de ExPEC, três (11%) aves domiciliadas apresentaram o gene *iss*, sendo que duas (8%) o apresentaram em concomitância com os genes *iroN*, *ompT* e *hlyF*, todos característicos do subgrupo das APEC (Tabela 2); portanto, embora as aves fossem saudáveis, eram portadoras de genes potencialmente patogênicos. Estes mesmos genes já foram detectados por outros pesquisadores em amostras de APEC de aves silvestres doentes e assintomáticas (SAIDENBERG, 2008). Em psitacídeos de vida livre saudáveis, 14 dos 44 isolados de *E. coli*, apresentaram expressão de genes compatíveis com o patotipo APEC, indicando que, apesar do potencial para desenvolver a doença, diversos fatores comumente presentes em aves de cativeiro, como estresse por superlotação, dieta inadequada, período reprodutivo, não representam influência tão importante em aves de vida livre, provavelmente devido a uma relação parasita/hospedeiro em maior equilíbrio (SAIDENBERG et al., 2012).

Em estudo analisando 200 isolados de UPEC humana e 524 isolados de APEC, verificou-se significância estatística na associação entre UPEC e APEC, reforçando a hipótese de que as aves possam ser veículos de *E. coli* patogênica para humanos (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005). Aventa-se, portanto, a possibilidade de risco de transmissão desta zoonose pelas aves do presente estudo, as quais eram domiciliadas, mantinham contato estreito com seus proprietários e eram portadoras de genes APEC.

No estudo aqui discorrido, não houve presença dos genes de virulência pesquisados para o grupo diarréogênico (*stx1*, *stx2*, *ST*, *LT*, *ial*, *eagg* e *eae*). Entretanto, já foram relatadas, em amostras fecais de psitacídeos, a presença do gene *eae*, característico de *E. coli* enteropatogênica e sugerindo a participação dessas aves como reservatório de EPEC para humanos (KNÖBL e MENÃO, 2010). Apesar do reservatório natural de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) sorotipo O157:H7 ser o trato gastrointestinal de bovinos (NATARO e KAPER, 1998), o seu isolamento já ocorreu em diversas espécies de animais sadios, entre eles aves silvestres

(TRABULSI e SAMPAIO, 1999). Talvez devido ao número relativamente pequeno de isolados nesta pesquisa estas cepas não foram isoladas.

Durante a análise filogenética observou-se que a maior parte das cepas pertenceu ao grupo filogenético B1 (67%), seguido pelo A (22%) e B2 (11%). As duas cepas que se apresentaram genotipicamente como APEC pertenceram ao grupo filogenético B1 e a cepa que apresentou somente o gene *iss* pertenceu ao grupo A. Tem-se relatado maior encontro de isolados comensais nos grupos A e B1, e ExPEC no B2 (CLERMONT et al., 2000; PITOUT, 2012; SMITH et al., 2007). Entretanto, estudos também observaram ocorrência de APEC nos grupos filogenéticos A e B1 em fragatas de vida livre (SAVIOLLI, 2010) e grupo A em calopsitas (SAIDENBERG, 2008). Devido à divergência de resultados, aparentemente, o método proposto para o agrupamento filogenético não seja o mais adequado para a classificação de amostras de *E. coli* de origem aviária quanto a sua patogenicidade (SAIDENBERG, 2008).

Todas as cepas deste estudo foram resistentes a, pelo menos, uma das drogas testadas, com exceção de nitrofurantoína, mesmo resultado obtido em estudo realizado com psitacídeos silvestres advindos de criatório conservacionista (CORRÊA, 2012).

Nesta pesquisa, 30% das cepas apresentaram resistência a sete ou mais drogas antibacterianas, 67% resistência a mais de duas classes de antimicrobianos e 59% multirresistência. Verificou-se em cerca de metade dos 16 isolados multirresistentes, resistência a quatro ou mais classes de antibacterianos. Atualmente, a resistência por *E. coli* a pelo menos dois ou mais grupos de antimicrobianos é considerada achado comum, tanto em medicina humana quanto em veterinária (BAUM e MARRE, 2005; PONS et al., 2012). Esta situação resulta em um grande impacto nas opções terapêuticas viáveis, e na dispersão destes patógenos na comunidade, sendo um dos problemas de grande relevância na saúde pública mundial (BAUM e MARRE, 2005; PONS et al., 2012; SMITH et al., 2007).

Três cepas, oriundas de criatório comercial, apresentaram resistência a 9 ou 10 antibacterianos. Poderia, talvez, se associar a alta resistência ao uso indiscriminado de antimicrobianos em doenças ocorridas na propriedade, nas quais não se obteve um diagnóstico preciso, sendo tratadas empiricamente.

A maior porcentagem de resistência neste projeto ocorreu frente aos β-lactâmicos (93%), sendo 89% das cepas resistentes às penicilinas. Diversos autores também têm observado alta porcentagem de resistência às penicilinas, com variação

entre 70% e 100% em psitacídeos e passeriformes (BRACONARO, 2012; HIDASI, 2010). A elevada resistência está relacionada, principalmente, à seleção pelo antimicrobiano de linhagens resistentes, com posterior transferência horizontal (FERREIRA e KNOBL, 2009).

Neste trabalho, foi possível observar que 52% das cepas apresentaram o perfil ESBLs (β -lactamases de espectro estendido) por possuírem o gene *blaTEM*, verificado em 63% dos isolados resistentes à ampicilina, 59% dos resistentes à amoxicilina, 57% à cefalexina e 33% ao ceftiofur. Acredita-se que até 90% da resistência à ampicilina em *E. coli* seja devido à produção da enzima TEM-1 codificada pelo gene *blaTEM* (LIVERMORE, 1995).

Os isolados apresentaram alta resistência também aos aminoglicosídeos (74%), sendo o maior nível de resistência observado em relação à estreptomicina (67%). Níveis de resistência similares já foram verificados em aves silvestres (63%) (IKUNO et al., 2008). Nesta pesquisa, observou-se que o gene *strA/B* foi o mais frequente, ocorrendo em 85% das cepas resistentes à estreptomicina. Os genes *aadA* e *aphaA* foram verificados em três cepas pertencentes ao mesmo animal, concordando com Sáenz e colaboradores (2004) que detectaram os mesmos genes *aadA* e *aphaA* em, respectivamente, 16 e oito de 17 cepas resistentes à estreptomicina isoladas de humanos e de animais.

Na literatura disponível em aves, os pesquisadores têm relatado frequências de resistência às tetraciclinas variando de 41 a 83% (BARBIERI, 2010; OBENG et al., 2012). O mecanismo de resistência a estas drogas está associado à presença de diversos genes, dentre eles *tetA* e *tetB* (ROBERTS, 1996). Neste estudo, todas as cepas resistentes à tetraciclina apresentaram algum destes genes, ressaltando que o *tetB* foi detectado em 80% delas. Em cepas humanas o gene *tetB* também tem sido o mais relatado (BRYAN et al., 2004).

Tem-se demonstrado baixos índices de resistência à ciprofloxacina e enrofloxacina em cepas provenientes de aves silvestres (BRACONARO, 2012; SANTOS et al., 2010); entretanto, nesta pesquisa, os isolados apresentaram 41% de resistência às quinolonas. Esta alta porcentagem de resistência pode estar relacionada à pressão seletiva, resultado de tratamentos empíricos, sem orientação veterinária por parte dos proprietários, tendo em vista a existência de formulação comercial com esta classe antimicrobiana voltada ao mercado de aves pet, sem controle governamental em sua comercialização.

Pesquisadores têm referido altos percentuais de resistência às sulfonamidas, atingindo 72% (HIDASI, 2010). As cepas aqui isoladas, embora tenham apresentado menor índice de resistência (33%), possuíam os genes *sul1*, *sul2*, e *sul3*, os quais também têm sido relatados em cepas resistentes de origem humana (GRAPE et al., 2003).

O aumento de resistência das bactérias Gram-negativas é imputado principalmente aos genes móveis em plasmídeos, os quais podem ser disseminados dentro das populações bacterianas (KUMARASAMY et al., 2010). Viagens aéreas, migrações humanas e trânsito de animais permitem que plasmídeos bacterianos possam ser transportados rapidamente entre países e continentes (KUMARASAMY et al., 2010). Plasmídeos conjugativos de grupos Inc são relacionados à dispersão da resistência bacteriana (CARATTOLI, 2009). Quatro foram os plasmídeos aqui detectados, IncFIB, IncFIA, IncY e Incl1. O IncFIB foi observado em cepas que apresentaram resistência fenotípica aos β-lactâmicos, aos aminoglicosídeos e às quinolonas. Em acordo com o observado neste projeto, a bibliografia disponível refere que os plasmídeos da família IncF são amplamente distribuídos em *E. coli* comensais, mas carreiam genes de resistência às quinolonas, aos aminoglicosídeos e genes para codificação de cepas ESBLs (CARATTOLI, 2009; HOPKINS et al., 2006).

As cepas que apresentaram o plasmídeo Incl1 foram fenotipicamente resistentes às penicilinas e uma delas resistente à cefalexina. Os plasmídeos Incl1 e IncY estão relacionados com a distribuição de genes para aquisição de ESBLs e de resistência às quinolonas (CARATTOLI, 2013). O Incl1 é caracterizado também pela codificação do *pili* de tipo IV, que contribui para a adesão e invasão bacteriana, sendo considerado um fator de virulência de *E. coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) (CARATTOLI, 2009), contribuindo com o potencial patogênico apresentado pelas cepas APEC neste estudo.

Verificou-se alta resistência antimicrobiana das cepas isoladas de calopsitas saudáveis mantidas em cativeiro, incluindo multirresistência e a presença de genes e plasmídeos de resistência. O papel dos pets na manutenção e disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos é relevante na saúde pública, ressaltando-se a importância do controle na utilização de antimicrobianos em animais.

Apesar da baixa porcentagem de isolamento de cepas de *E. coli* (10%), aquelas caracterizadas com potencial patogênico apresentaram importantes fatores de virulência, com reconhecido risco zoonótico. Seria interessante a ampliação do

número de aves amostradas e a intensificação de pesquisas nesta área, para um melhor conhecimento do papel que estes microrganismos desempenham no microbioma, em infecções e na transmissão de doenças ao homem e outras espécies animais. Além disso, deve-se salientar que é papel do médico veterinário a orientação dos proprietários e criadores na manipulação e cuidados sanitários com estas aves.

7. CONCLUSÕES

As calopsitas estudadas não apresentaram bactérias do gênero *Salmonella* compondo seu microbioma intestinal, como também *E. coli* com potencial diarreiogênico, não se constituindo em elo de importância epidemiológica na disseminação desses microrganismos.

Foram isoladas cepas de *E. coli* com potencial patogênico e zoonótico no que se refere às ExPEC, em especial as APEC.

As cepas de *E. coli* isoladas demonstraram altos níveis de resistência aos antibacterianos, com grande proporção de multirresistência.

Os isolados de *E. coli* apresentaram plasmídeos e genes de resistência aos grupos dos β-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas e sulfonamidas, demonstrando alto potencial de disseminação de multirresistência, pelo contato estreito entre humanos e calopsitas de companhia.

REFERÊNCIAS³

- ALLGAYER, M. C. OLIVEIRA, S. J; MOTIN, V. D; LOIKO, M. R; ABILLEIRA, F; GUEDES, N. M. R; PASSOS, D. T; WEIMER, T. A. Isolamento de *Salmonella* Braenderup em arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). **Cienc Rural**, v. 39, p. 2542-2545, 2009.
- ALLGAYER, M. C; LIMA-ROSA, C. A; WEIMER, T. A; RODENBUSCH, C. R; PEREIRA, R. A; STRECK, A. F; OLIVEIRA, S. D; CANAL, C. W. Molecular diagnosis of *Salmonella* spp. in captive psittacine birds. **Vet Rec**, v.162, p.816-819, 2008.
- ANDREATTI FILHO, R. L. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2006. 314p.
- BARBIERI, N. L. Resistência a antibióticos, prevalência dos fatores associados a virulência, tipagem filogenética e perfil filogenético de isolados de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC). Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- BAUM, V. H; MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **Int J Med Microbiol**, v.295, p.503-511, 2005
- BÉLANGER, L; GARENAUX, A; HAREL, J; BOULIANNE, M; NADEAU, E; DOZOIS, C. M. *Escherichia coli* form animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. **Immunol Med Microbiol**, v. 62, p. 1-10, 2011.
- BENEZ, S. M. **Aves, criação, teoria, prática: silvestres, ornamentais, avinhados**. 4.ed. Ribeirão Preto: Tecmed, 2004. 600p.
- BRACONARO, P. Caracterização das microbiotas bacteriana e fúngica presentes em cloacas de passeriformes silvestres confiscados do tráfico que serão submetidos a programas de solturas. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia experimental aplicada às zoonoses) – Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- BRYAN, A; SHAPIR, N; SADOWSKY, M. J; Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. **Appl Environ Microbiol**, v.70, p.2503-2507, 2004,
- CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **Int J Med Microbiol**, v.303, p. 298-304, 2013.
- CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p. 2227-2238, 2009.

³ De acordo com: Guia de normalização para apresentação de trabalhos acadêmicos da Universidade Paulista: ABNT / Biblioteca Universidade Paulista, UNIP / revisada e atualizada pelas bibliotecárias Alice Horiuchi e Bruna Orgler Schiavi. – 2014. 49 p.: il. color.

CARVALHO, V. M. Colibacilose e salmonelose. In: Cubas, Z. S.; SILVA J. C. R.; CATÃO-DIAS J. L. (ed.), **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p.742-750.

CARVALHO, V. M. OSUGUI, L; SETZER, A. P; LOPEZ, R. P; PESTANA DE CASTRO, A. F; IRINO, K; CATÃO-DIAS, J. L. Characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from captive wild felids with bacteremia. **J Vet Diagn Invest**, v. 24, p. 1014-1016, 2012.

CARVALLO, F. R; DEBROY, C; BAEZA, E; HINCKLEY, L; GILBERT, K; CHOI, S. J; RISATTI, G; SMYTH, J. A. Necrotizing pneumonia and pleuritis associated with extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in a tiger (*Panthera tigris*) cub. **J Vet Diagn Invest**, v. 22, p.136-140, 2010.

CATTOIR, V; POIREL, L; ROTIMI, V; SOUSSY, C. J; NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **J Antimicrob Chemother**, v.60, p.394–397, 2007.

CAVACO, L. M; HASMAN, H; XIA, S; AARESTRUP, F. M. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p.603–608, 2009.

CIESIELCZUK, H; HORNSEY, M; CHOI, V; WOODFORD, N; WAREHAM, D. W; Development and evaluation of a multiplex PCR for eight plasmid-mediated quinolone-resistance determinants. **J Med Microbiol**, v.62, p.1823-1827, 2013.

CLERMONT, Q.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, p.4555-4558, 2000.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.

CORRÊA, I. M. O. Enterobactérias e fatores de virulência de *Escherichia coli* isolada de psitacídeos. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

CORREA, I. M; FLORES, F; SCHNEIDERS, G. H; PEREIRA, L. Q; BRITO, B. G; LOVATO, M. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. **Pesq Vet Bras**, v. 33, p.241-246, 2013.

CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat Rev Microbiol**, v.8, p.26-38, 2010.

CUBAS, Z. S; GODOY, S. N. Medicina e patologia de aves de companhia. In.: AGUILAR, R; HERNÁNDEZ-DIVERS, S. M; HERNÁNDEZ-DIVERS, S. J. **Atlas de medicina, terapêutica e patologia de animais exóticos**. São Caetano do Sul: Interbook, 2007, p.213-264.

CUNHA, M. P. V; MENÃO, M. C; FERREIRA, A. J. P; KNÖBL, T. 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? **Rev Educ Cont Vet Med Zootec**, v. 11, p.22 – 31, 2013.

DALLENNÉ, C; COSTA, A; DECRE, D; FAVIER, C; ARLET, G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v.65, p.490-495, 2010.

EWERS, C. WILKING, H. KISSLING, S. ALT, K. ANTАО, E.M. LATURNUS, C. DIEHL, I. GLODDE, S. HOMEIER, T. BOHNKE, U. STEINRUK, H. PHILIPP, H. C. WIELER, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **Int J Med Microbiol**, v.297, p.163-176, 2007.

FENGA, C; CACCIOLA, A; DI NOLA, C; CALIMERI, S; LO GIUDICE, D; PUGLIESE, M; NIUTTA, P. P; MARTINHO, L. B. Serologic investigation of the prevalence of *Chlamydophila psittaci* in occupationally-exposed subjects in eastern Sicily. **Ann Agric Environ Med**, v. 14, p.93-96, 2007.

FERNANDES, S. A; PATERSON, D. L; GHILARDI-RODRIGUES, A. C; ADAMS-HADUCH, J. M; TAVECHIO, A. T; DOI, Y. CTX-M-2-producing *Salmonella typhimurium* isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microb Drug Resist**, v.15, p.317–321, 2009.

FERREIRA, A. J. P.; KNOBL, T. Colibacilose aviaria. In: BERCHIERI JUNIOR, A. SILVA, E. N. DI FABIO, J. SEST, L. ZUANAZE, M. A. **Doenças das Aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. p.197-205.

FLAMMER, K; DREWES, L. A. Species-related differences in the incidence of gram-negative bacteria isolated from the cloaca of clinically normal psittacine birds. **Avian Dis**, v.32, p.79-83, 1988.

FOTIN, C. M. P. Levantamento prospectivo dos animais silvestres, exóticos e domésticos não convencionais, em cativeiro domiciliar, atendidos em clínicas particulares no município de São Paulo: aspectos do manejo e principais afecções. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FRANCIA, M. V; VARSAKI, A; GARCILLAN-BARCIA, M. P; LATORRE, A; DRAINAS, C; LA CRUZ, F. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. **FEMS Microbiol Rev**, v.28, p.79–100, 2004.

GANNON, V. P; RASHED, M; KING, R. K; THOMAS, E. J. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v. 5, p. 1268-1274, 1993.

GAST, R. K. *Salmonella* infections. In: SAIF, Y .M. **Diseases of poultry**. 11.ed. Iowa: Iowa State University, 2003. p.19-24.

GLANTZ, S. A. **Princípios de bioestatística**. 7.ed. São Paulo: AMGH Editora, 2013. 320p.

GODOY, S. N. Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, 2006. p.222-250.

GRAHAM, C. L; GRAHAM, D. L. Occurrence of *Escherichia coli* in feces of psittacine birds. **Avian Dis**, v.22, p.717-720, 1978.

GRAPE, M; SUNDSTRÖM, L; KRONVALL, G. Sulphonamide resistance gene *su3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. **J Antimicrob Chemother**, v.52, p.1022-1024, 2003

GRESPAN, A. Clamidiose em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*): perfil proprietário e ensaio terapêutico. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia experimental aplicada às zoonoses) – Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GRIMONT, P. A. D; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9.ed. London: WHOCC, 2007.

GUARDABASSI, L; DIJKSHOORN, L; COLLARD, J. M; OLSEN, J. E; DALSGAARD, A. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. **J Med Microbiol**, v.49, p.929–936, 2000.

GUERRANT, R. L; VAN GILDER, T; STEINER, T. S; THIELMAN, N. M; SLUTSKER, L; TAUXE, R. V. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin Infect Dis**, v.32, p.331–351, 2001.

HAMIDIAN, M; TAJBAKHSH, M; TOHIDPOUR, A; RAHBAR, M; ZALI, M. R; WALTHER-RASMUSSEN, J. Detection of novel *gyrA* mutations in nalidixic acid-resistant isolates of *Salmonella enterica* from patients with diarrhoea. **Int J Antimicrob Agents**, v.37, p.360-364, 2011.

HAMMERUM, A. M. HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. **Clin Infect Dis**, v.48, p.916-921, 2009.

HARCOURT-BROWN, N. H. Aves Psitaciformes. In.: TULLY, T. N; DORRESTEIN, G. M; JONES, A. K. **Clínica de aves**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.122-149.

HIDASI, H. W. Detecção de Enterobacteriaceae e *Chlamydophila* spp. em psitacídeos provenientes do centro de triagem de animais selvagens de Goiás. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

HIRSH, D. C. *Salmonella*. In: HIRSH, D. C; ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2003. p.69-73.

HOPKINS, K. L; LIEBANA, E; VILLA, L; BATCHELOR, M; THRELFALL, E. J; CARATTOLI, A. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY β -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, p.3203–3206, 2006.

IKUNO, A. A; GAMA, N. M. S. Q; GUASTALLI, E. A. L; GUIMARÃES, M. B; FERREIRA, V. C. A. Características de isolados de *Escherichia coli* provenientes de aves silvestres quanto a genes de virulência e resistência a antibióticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35, 2008, Gramado, **Anais...**, Gramado, 2008.

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

JOHNSON, T. J; NOLAN, L. K. Plasmid replicon typing. **Methods Mol Biol**, v.551, p.27-35, 2009.

JOHNSON, T. J; WANNEMUEHLER, Y. M; JOHNSON, S. J; LOGUE, C. M; WHITE, D. G; DOETKOTT, C; NOLAN, L. K. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Appl Environ Microbiol**, v.73, p.1976–1983, 2007.

JOHNSON, T. J; WANNEMUEHLER, Y. M; NOLAN, L. K. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, v.74, p.2360-2369, 2008.

KANASHIRO, A. M. I; CASTRO, A. G. M; CARDOSO, A. L. S. P; TESSARI, E. N. C; TAVECHIO, A. T. Persistência de *Salmonella* sp. após antibioticoterapia em psitacídeos pertencentes a um criadouro comercial. **Arq Inst Biol**, v.69, p.99-101, 2002.

KAPER, J. B; NATARO, J. P; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v.2, p.123–140, 2004.

KNÖBL, T; GODOY, S. N. MATUSHIMA, E. R; GUIMARÃES, M. B; FERREIRA, A. J. P. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v. 45, p.54-60, 2008.

KNÖBL, T; MENÃO, M. C. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from psittacine birds. **FIEP bulletin**, v.80, p.839-841, 2010.

KONEMAN, E. W; ALLEN, S. D; JANDA, W. M; SCHRECKENBERGER, P. C; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1608p.

KUMARASAMY, K. K; TOLEMAN, M. A; WALSH, T. R; BAGARIA, J; BUTT, F. A; BALAKRISHNAN, R; CHAUDHARY, U; DOUMITH, M; GISKE, C. G; IRFAN, S; KRISHNAN, P; KUMAR, A. V; MAHARJAN, S; MUSHTAQ, S; NOORIE, T;

PATERSON, D. L; PEARSON, A; PERRY, C; PIKE, R; RAO, B; RAY, U; SARMA, J. B; SHARMA, M; SHERIDAN, E; THIRUNARAYAN, M. A; TURTON, J; UPADHYAY, S; WARNER, M; WELFARE, W; LIVERMORE, D. M; WOODFORD, N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infect Dis**, v.10, p.597-602, 2010.

LE BOUGUENEC, C; ARCHAMBAUD, M; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v. 30, p. 1189-1193, 1992.

LIVERMORE, D. M. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev**, v.8, p.557-558, 1995.

MADSEN, L; AARESTRUP, F. M; OLSEN, J. E. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella* Typhimurium. **Vet Microbiol**, v.75, p.73–82, 2000.

MAYNARD, C; BEKAL, S; SANSCHAGRIN, F; LEVESQUE, R. C; BROUSSEAU, R; MASSON, L; LARIVIÈRE, S; HAREL, J. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates from animal and human origin. **J Clin Microbiol**, v.42, p.5444-5452, 2004.

MICHAEL, G. B.; SIMONETI, R.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Comparison of different selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from feces of finishing swine. **Braz J Microbiol**, v.34, p.138-142, 2003.

MOKADY, D.; URI-GOPHNA RON, E. Z. Extensive gene diversity in septicemia *Escherichia coli* strains. **J Clin Microbiol**, v. 43, p.66-73, 2005.

MOULIN-SCHOULEUR, M; RÈPÈRANT, M; LAURENT, S; BRÉE, A; MIGNON-GRASSTEAU, S; GERMON, P, RASSCHAERT, D; SCHOULER, C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. **J Clin Microbiol**, v.45, p.3366-3376, 2007.

NATARO, J. P; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microb Rev**, v.11, p.142-201, 1998.

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**, v. 27, p.101-110, 2003.

NORDSTROM, K. Plasmid R1 – replication and its control. **Plasmid**, v.55, p.1–26, 2005.

OBENG, A. S; RICKARD, H; NDI, O; SEXTON, M; BARTON, M. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. **Vet Microbiol**, v.154, p.305-315, 2012.

OLSVIK, O; RIMSTAD, E; HORNES, E; STROCKBINE, N; WASTESON, Y; LUND, A; WACHSMUTH, K. A nested PCR followed by magnetic separation of amplified fragments for detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes. **Mol Cell Probes**, v.5, p.429-435, 1991.

PERRETER, V; BOERLIN, P. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, p.1169–1172, 2003.

PITOUT, J. D. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Front Microbiol**, v.3, p.1-7, 2012.

POLLARD, D. R; JOHNSON, W. M; LIOR, H; TYLER, S. D; ROZEE, K. R. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v.28, p.540-545, 1990.

PONS, M. J; MOSQUITO, S. OCHOA, T. J; VARGAS, M; MOLINA, M; LLUQUE, A; GIL, A. I; ECKER, L; BARLETTA, F; LANATA, C. F; DEL VALLE, L. J; RUIZ, J. Niveles de resistencia a antimicrobianos, em especial a quinolonas, em cepas de *Escherichia coli* comensales em niños de la zona periurbana de Lima, Peru. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v.29, p.82-86, 2012.

RAMCHANDANI, M; MANGES, A. R; DEBROY, C; SMITH, S. P; JOHNSON, J. R; RILEY, L. W. Possible Animal Origin of human-associated. Multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. **Clin Infect Dis**, v.40, p.251-257, 2005.

ROBERTS, M. C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiol Rev**, v.19, p.1-24, 1996.

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, 2005.

RUSSO, T. A; JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes Infect**, v.5, p.449–456, 2003.

RUSSO, T. A; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J Infect Dis**, v.181, p.1753-1754, 2000.

SÁENZ, Y; BRIÑAS, L; DOMÍNGUEZ, E; RUIZ, J; ZARAZAGA, M; VILA, J; TORRES, C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p.3996-4001, 2004.

SAIDENBERG, A. B. S. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas. Dissertação (Mestrado em

Epidemiologia experimental aplicada às zoonoses) – Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SAIDENBERG, A. B; TEIXEIRA, R; HIDALGO, F; GUEDES, N. M. R; ALLGAYER, M. C; MELVILLE, P. A; BENITES, N. R. Molecular detection of enteropathogenic *Escherichia coli* in asymptomatic captive psittacines. **Pesq Vet Bras**, v.32, p.922-926, 2012.

SANTOS, E. J; CARVALHO, E. P; SANCHES, R. L; BARRIOS, B. E. B. Qualidade microbiológica de farinhas de carne e ossos produzidas no estado de Minas Gerais para produção de ração animal. **Cienc Agropec**, v.24, p.425-433, 2000.

SANTOS, H. F; FLÓRES, M. L; LARA, V. M; SILVA, M. S; BATTISTI, L; LOVATO, L. T. Microbiota cloacal aeróbia de cracídeos cativeiros no Rio Grande do Sul e sua susceptibilidade a antimicrobianos. **Pesq Vet Bras**, v.30, p.1077-1082, 2010.

SAVIOLLI, J. Y. Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada). Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010

SHINOHARA, N. K. S; BARROS, V. B; JIMENEZ, S. M. C; MACHADO, E. C. L; DUTRA, R. A. F; LIMA FILHO, J. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Cien Saude Colet**, v.13, p.1675-1683, 2008.

SMITH, J. L; FRATAMICO, P; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: review. **Foodborne Pathog Dis**, v.4, p.134-163, 2007.

SONCINI, R. A. Controle de *Salmonella enteritidis* na avicultura. 2002, Chapecó. Anais do III Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais0204_bsa_soncini.pdf. Acesso em 22/04/2012.

SPENCER, L. Pets prove therapeutic for people with AIDS. **J Am Vet Med Assoc**, v.201, p.1665-1668, 1992.

TOMPKINS, D. M; DUNN, A. M; SMITH, M. J; TELFER, M. Wildlife diseases: from individuals to ecosystems. **J Anim Ecol**, v.80, p.19-38, 2011.

TRABULSI, L. R; SAMPAIO, M. M. C. Diarréia por *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). **Estud Av**, v.13, p.116-117, 1999.

WAREHAM, D. W; UMAREN, I; KHANNA, P; GORDON, N. C. Allele-specific polymerase chain reaction (PCR) for rapid detection of the aac(69)-lb-cr quinolone resistance gene. **Int J Antimicrob Agents**, v.36, p.476–477, 2010.

WINOKUR, P. L; CANTON, R; CASELLAS, J. M; LEGAKIS, N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype

and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. **Clin Infect Dis**, v.15, p.94-103, 2001.

YAMAMOTO, S; TERAI, A; YURI, K; KURAZONO, H; TAKEDA, Y; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.12, p.85-90, 1995.

YAMANE, K; WACHINO, J; SUZUKI, S; ARAKAWA, Y. Plasmid mediated qepA gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p.1564–1566, 2008.

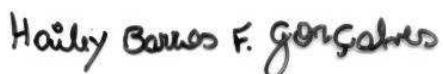
ANEXOS

Anexo a: Certificado do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEP/CEUA)

C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 237/14 CEUA/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Escherichia coli patofênica extra-intestinal (ExPEC) e salmonella spp em calopsitas (*Nymphicus Hollandicus*) mantidas como animais de companhia na cidade de São Paulo e região metropolitana.”sob a responsabilidade” Patrícia Silveira de Pontes e Renata Iovine”, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Federal nº 11.794/08 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 14 dias do mês de maio de 2014.



Hailey Barros F. Gonçalves
Secretária do Comitê de Ética
em Pesquisa da UNIP

Anexo b: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em pesquisa com seres humanos.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pesquisa de Escherichia coli patogênica extra-intestinal (ExPEC) e Salmonella spp. em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*): Perfil zoonótico e resistência antimicrobiana

Pesquisador: Patricia Silveira de Pontes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38523314.5.0000.5512

Instituição Proponente: Universidade Paulista - UNIP / Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.024.542

Data da Relatoria: 11/02/2015

Apresentação do Projeto:

De acordo com as normas da Instituição.

Objetivo da Pesquisa:

Pesquisar a presença de ExPEC e Salmonella spp., bem como, a resistência desta a antibióticos, em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) saudáveis mantidas em cativeiro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos : mínimos; benefícios: avaliar potencial zoonótico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante vez que as formas estudadas possuem grande potencial zoonótico e alta taxa deletalidade nos animais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Após as correções solicitadas encontram-se de acordo.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto liberado.

Endereço: Rua Dr. Barcelar,1212

Bairro: Vila Clementino

CEP: 04.026-002

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5586-4090

Fax: (11)5586-4073

E-mail: cep@unip.br

**UNIVERSIDADE PAULISTA -
UNIP - VICE-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS**



Continuação do Parecer: 1.024.542

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao término da pesquisa é obrigatória a entrega do relatório final.

SAO PAULO, 15 de Abril de 2015

**Assinado por:
MENDEL ABRAMOWICZ
(Coordenador)**

Endereço: Rua Dr. Barcelar, 1212

Bairro: Vila Clementino

CEP: 04.026-002

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5586-4090

Fax: (11)5586-4073

E-mail: cep@unip.br

Anexo c. Questionário sobre manejo e histórico de saúde das calopsitas avaliadas e humanos contactantes.

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL: _____ SEXO: _____

PROCEDÊNCIA: _____ IDADE: _____

DATA DE CHEGADA (LOJA/ DOMICÍLIO): _____

PROPRIETÁRIO: _____

CONTATO: _____

DATA DA COLHEITA DA AMOSTRA: _____

QUESTIONÁRIO:

POSSUI OUTROS ANIMAIS ALÉM DA AVE?

- () NÃO POSSUO OUTROS ANIMAIS.
- () CÃES. QUANTOS? _____
- () GATOS. QUANTOS? _____
- () AVES DOMÉSTICAS. QUANTAS? _____
- () AVES SILVESTRES. QUANTAS? _____
- () OUTROS: _____

ONDE A AVE É MANTIDA?

- () ESTRITAMENTE EM GAIOLA/ VIVERO
- () EM GAIOLA, PORÉM É SOLTA PARTE DO DIA
- () POSSUI GAIOLA, PORÉM É SOLTA A MAIOR PARTE DO DIA
- () SOLTA.

QUANDO A AVE É SOLTA, QUAIS OS LOCAIS QUE ELA POSSUI ACESSO?

- () A AVE NUNCA É SOLTA
- () SOMENTE A PARTE DE CIMA DA GAIOLA
- () AO JARDIM
- () MESA OU OUTROS LOCAIS DA COZINHA
- () SALA OU QUARTO DO PROPRIETÁRIO
- () ACESSO LIVRE A TODA A CASA
- () OUTRO: _____

A AVE POSSUI CONTATO DIRETO COM OUTROS ANIMAIS?

- () NÃO.
- () CÃES. QUANTOS? _____
- () GATOS. QUANTOS? _____
- () AVES DOMÉSTICAS. QUANTAS? _____
- () AVES SILVESTRES. QUANTAS? _____
- () OUTROS: _____

SOBRE A LIMPEZA DA GAIOLA:

- () É REALIZADA AO MENOS DUAS VEZES AO DIA
- () É REALIZADA DIARIAMENTE
- () É REALIZADA A CADA DOIS DIAS OU MAIS
- () É REALIZADA SEMANALMENTE
- () OUTRO: _____

SOBRE A LIMPEZA DOS POLEIROS E ACESSÓRIOS:

- () É REALIZADA AO MENOS DUAS VEZES AO DIA
- () É REALIZADA DIARIAMENTE
- () É REALIZADA A CADA DOIS DIAS OU MAIS
- () É REALIZADA SEMANALMENTE
- () OUTRO: _____

COMO É REALIZADA A LIMPEZA?

- () SOMENTE TROCA O SUBSTRATO
- () UTILIZA ÁGUA E SABÃO
- () UTILIZA ÁGUA E DESINFETANTES
- () NUNCA LAVOU A GAIOLA E ACESSÓRIOS
- () OUTRO: _____

AO REALIZAR A LIMPEZA, UTILIZA ALGUMA PROTEÇÃO?

- () NÃO
- () SIM. QUAL? _____

QUAL O CONTATO DIRETO QUE POSSUI COM A AVE?

- NÃO POSSUI CONTATO DIRETO
- POSSUI CONTATO SOMENTE DURANTE A LIMPEZA DA GAIOLA E ACESSÓRIOS
- POSSUI POUCO CONTATO COM A AVE
- ESTÁ SEMPRE EM CONTATO COM A AVE (BRINCA, BEIJA, MANTÉM NO COLO, ETC)
- OUTRO: _____

A AVE JÁ APRESENTOU ALGUMA ALTERAÇÃO INTESTINAL?

- NUNCA
- SIM, PORÉM HOUVE MELHORA SEM NECESSIDADE DE TRATAMENTO
- SIM, PORÉM HOUVE MELHORA COM TRATAMENTO VETERINÁRIO
- SIM, PORÉM HOUVE MELHORA COM MEDICAÇÃO SEM ORIENTAÇÃO VETERINÁRIA.

A AVE JÁ APRESENTOU ALGUMA DOENÇA RESPIRATÓRIA?

- NUNCA
 - SIM, PORÉM HOUVE MELHORA SEM NECESSIDADE DE TRATAMENTO
 - SIM, PORÉM HOUVE MELHORA COM TRATAMENTO VETERINÁRIO
 - SIM, PORÉM HOUVE MELHORA COM MEDICAÇÃO SEM ORIENTAÇÃO VETERINÁRIA
- QUANDO: _____

A AVE JÁ APRESENTOU ALGUM OUTRO TIPO DE DOENÇA?

- NUNCA
 - SIM, PORÉM HOUVE MELHORA SEM NECESSIDADE DE TRATAMENTO
 - SIM, PORÉM HOUVE MELHORA COM TRATAMENTO VETERINÁRIO
 - SIM, PORÉM HOUVE MELHORA COM MEDICAÇÃO SEM ORIENTAÇÃO VETERINÁRIA
- QUAL? _____ QUANDO: _____

HOUVE MORTE DE ALGUMA OUTRA AVE POR DOENÇA OU MORTE-SÚBITA?

- NUNCA POSSUI OUTRA AVE
- NÃO
- SIM. QUANTAS? _____

O PROPRIETÁRIO (OU OUTRAS PESSOAS QUE POSSUEM CONTATO COM A AVE) APRESENTOU DOENÇA NO TRATO URINÁRIO DESDE A CHEGADA DA AVE?

- NÃO
- SIM.

FORAM REALIZADOS EXAMES PARA O DIAGNÓSTICO DA CAUSA?

- NÃO
- SIM. QUAIS? _____

O PROPRIETÁRIO (OU OUTRAS PESSOAS QUE POSSUEM CONTATO COM A AVE) APRESENTOU DOENÇA INTESTINAL DESDE A CHEGADA DA AVE?

- NÃO
- SIM.

FORAM REALIZADOS EXAMES PARA O DIAGNÓSTICO DA CAUSA?

- NÃO
- SIM. QUAIS? _____

PESSOAS COM DOENÇAS CRÔNICAS POSSUEM CONTATO COM A AVE?

- NÃO
 - SIM. QUAIS? _____
- QUAL A FAIXA ETÁRIA DAS PESSOAS QUE POSSUEM CONTATO COM A AVE?
- 0 A 5 ANOS
 - 6 A 15 ANOS
 - 16 A 25 ANOS
 - 26 A 40 ANOS
 - 41 A 59 ANOS
 - ACIMA DE 60 ANOS

Anexo d. Sequência dos iniciadores e tamanho dos amplificados para a pesquisa de marcadores de virulência e grupos filogenéticos de *E. coli* isoladas de calopsitas.

	Genes	Marcador	Sequência	Tamanho molecular pb	Referência
ExPEC	<i>papC</i>	Fímbria P (associada a pielonefrite)	5'GCAGGCTGTACTGCAGGGTGGCG3'	328	Le Bouguenec et al., 1992
			5'ATATCCTTCTGCAGGGATGCAATA3'		
	<i>papEF</i>	Fímbria P	5'GCAACAGCAACGCTGGTGCATCAT3'	336	Yamamoto et al., 1995
			5'AGAGAGAGCCATTCTTACGGACA3'		
	<i>sfa</i>	Fímbria S (específica para ácido siálico)	5'CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC3'	410	Le Bouguenec et al., 1992
			5'CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA3'		
	<i>fyuA</i>	Sideróforo: Yersiniabactina (receptor)	5'TGATTAACCCCGCGACGGAA3'	787	Johnson e Stell, 2000
			5'CGCAGTAGGCAAGATGTTGTA3'		
	<i>cnf1</i>	Fator citotóxico necrotizante 1	5'AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGGAG3'	498	Yamamoto et al., 1995
			5'CATTAGAGTCCTGCCCTCATTATT3'		
	<i>malX</i>	Marcador associado a ilha de patogenicidade	5'GGACATCCTGTTACAGCGCGCA3'	925	Johnson e Stell, 2000
			5'TGCCACCAATCACAGCCGAAC3'		
	<i>cvaC</i>	Plasmídeo ColV	5'CACACACAAACGGGAGCTGTT3'	679	Johnson e Stell, 2000
			5'CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT3'		
	<i>hlyA</i>	Hemolisina	5'AACAGGATAAGCACTGTTGGCT3'	1177	Yamamoto et al., 1995
			5'ACCATAAGCGGTATTCCCGTCA3'		

ExPEC Predtores de virulência para aves	<i>iroN</i>	Sideróforo: Salmochelina (receptor)	5'AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT3' 5'GTTCGGGCAACCCCTGCTTGACTT3'		553	Johnson et al., 2008
	<i>ompT</i>	Protease de membrana externa episomal	5'TCATCCCAGGAAGCCTCCCTCACTACTAT3' 5'TAGCGTTGCTGCAGTGGCTTGTGATAC3'		496	Johnson et al., 2008
	<i>hlyF</i>	Suposto gene de hemolisina aviária	5'GGCCACAGTCGTTAGGGTGCTTACC3' 5'GGCGGTTAGGCATTCCGATACTCAG3'		450	Johnson et al., 2008
	<i>iss</i>	Resistência sérica	5'CAGCAACCCGAACCAC TTGATG3' 5'AGCATTGCCAGAGCGGGCAGAA3'		323	Johnson et al., 2008
	<i>iutA</i>	Sideróforo: Aerobactina (receptor)	5'GGCTGGACATCATGGGA ACTGG3' 5'CGTCGGAACCGGGTAGAATCG3'		302	Johnson et al., 2008
	<i>eae</i>	<i>Attaching and effacing</i>	5'ACGTTGCAGCATGGTA ACTC3' 5'GATCGGCAACAGTTCACCTG3'		815	Gannon et al., 1993
Diarreogênicas	<i>stx1</i>	Toxina de Shiga 1	5'GGATGCATCTCTGGTCATTG3' 5'AGCGATGCAGCTATTAAATAA3'		130	Pollard et al., 1990
	<i>stx2</i>	Toxina de Shiga 2	5'CTTCGGTATCCTATTCCGG3' 5'GAAGACTCCGTGGATTACG3'		478	Pollard et al., 1990
	<i>chuA</i>	Gene de transporte heme em EHEC	5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3' 5'-TGCGGCCAGTACCAAAGACA-3'		279	Clermont et. al., 2000
	<i>yjaA</i>	Gene relacionado a <i>E. coli</i> K12	5'-TGAAGTGTCA GGAGACGCTG-3' 5'-ATGGAGAATGCGTT CCTCAAC-3'		211	Clermont et. al., 2000
Grupos Filogenéticos	TSPE4 .C2	Fragmento de DNA	5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3' 5'-CGCGCCAACAAAGTATTTACG-3'		152	Clermont et. al., 2000

Anexo e. Sequência dos iniciadores e tamanho dos amplificados para a pesquisa de marcadores resistência antimicrobiana de *E. coli* isoladas de calopsitas.

	Genes	Sequência	Tamanho molecular pb	Referência
Penicilinas	<i>blaTEM</i>	5'CATTCCGTGTCGCCCTTATTG3' 5'CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC3'	800	Dallenne et al. (2010)
	<i>blaSHV</i>	5'AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC3' 5'ATCCCGCAGATAAATCACCAC3'		
	<i>blaOXA</i>	5'GGCACCAAGATTCAACTTCAAG3' 5'GACCCCAAGTTCTGTAAAGTG3'	564	Dallenne et al. (2010)
	<i>CMY</i>	5'ATGATGAAAAATCGTTATGC3' 5'TTGCAGCTTTCAAGAACATGCGC3'		
	<i>CTX-M</i>	5'TCAAGCCTGCCGATCTGGT3' 5'TGATTCTGCCGCTGAAG3'	561	Dallenne et al. (2010)
Cefalosporina 2ª geração	<i>tetA</i>	5'GTAATTCTGAGCACTGTCG3' 5'CTGCCTGGACAACATTGCTT3'	937	Guardabassi et al. (2000)
	<i>tetB</i>	5'CTCAGTATTCCAAGCCTTG3' 5'CTAACGACTTGTCTCCTGTT3'		
	<i>aadA</i>	5'GCAGCGCAATGACATTCTTG3' 5'ATCCTTCGGCGCGATTTG3'	282	Maynard et al. (2004)
	<i>aphA</i>	5'ATGGGCTCGCGATAATGTC3' 5'CTCACCGAGGCAGTCCAT3'		
Aminoglicosídeos	<i>strAB</i>	5'ATGGTGGACCCTAAAACCT3' 5'CGTCTAGGATCGAGACAAAG3'	890	Cunha (2015)*
	<i>sul1</i>	5'TGGTACGGTGGTCGGCATTG3' 5'GCGAGGGTTCCGAGAAGGTG3'		
	<i>sul2</i>	5'CGGCATCGTCAACATAACC3' 5'GTGTGCGGATGAAGTCAG3'	722	Maynard et al. (2004)
	<i>sul3</i>	5'CATTCTAGAAAACAGTCGTAGTCG3' 5'CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTGG3'		
Sulfonamidas				Perreten e Boerlin. (2003)

Quinolonas	<i>qnrA</i>	5'CAGCAAGAGGATTCTCACG3' 5'AATCCGGCAGCACTATTACTC3'	630	Ciesielczuk et al. (2013)
	<i>qnrB</i>	5'GGCTGTCAGTTCTATGATCG3' 5'GAGCAACGATGCCTGGTAG3'	488	Ciesielczuk et al. (2013)
	<i>qnrC</i>	5'GCAGAATTCAAGGGTGTGAT3' 5'AACTGCTCCAAAAGCTGCTC3'	118	Ciesielczuk et al. (2013)
	<i>qnrD</i>	5'CGAGATCAATTACGGGAATA3' 5'ACAAAGCTGAAGCGCCTG3'	581	Cavaco et al. (2009)
	<i>qnrS</i>	5'GCAAGTTCATTGAACAGGGT3' 5'TCTAAACCCTCGAGTTGGCG3'	428	Cattoir et al. (2007)
	<i>oqxAB</i>	5'CCGCACCGATAAATTAGTCC3' 5'GGCGAGGTTTGATAGTGGA3'	313	Ciesielczuk et al. (2013)
	<i>aac</i>	5'TTCCAAGCGGGACGGAM3' 5'ACACGGCTGGACCATA3'	260	Wareham et al. (2010)
	<i>qepA</i>	5'GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG3' 5'CTTCCTGCCGAGTATCGTG3'	218	Yamane et al. (2008)

* CUNHA, M.P.V. Comunicação pessoal, 2015.

Anexo f. Sequência dos iniciadores e tamanho dos amplificados para a pesquisa de marcadores de grupos Inc de plasmídeos de *E. coli* isoladas de calopsitas.

Grupo Inc	Marcador	Sequência	Tamanho molecular pb	Referência
K/B	RNAI	5'GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC3' 5'TCTTTCACGAGCCCGCCAAA3'	160	Johnson e Nolan (2009)
W	repA	5'CCTAAGAACAAACAAAGCCCCG3' 5'GGTGCACGGCATAGAACCGT3'	242	Johnson e Nolan (2009)
FIIA	repA	5'CTGTCGTAAGCTGATGGC3' 5'CTCTGCCACAAACTTCAGC3'	270	Johnson e Nolan (2009)
FIA	Iterons	5'CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG3' 5'GTATATCCTTACTGGCTCCGCAG3'	462	Johnson e Nolan (2009)
FIB	repA	5'GGAGTTCTGACACACGATTTCTG3' 5'CTCCCCTCGCTTCAGGGCATT3'	702	Johnson e Nolan (2009)
Y	repA	5'AATTCAAACAAACACTGTGCAGCCTG3' 5'GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT3'	765	Johnson e Nolan (2009)
I1	RNAI	5'CGAAAGCCGGACGGCAGAA3' 5'TCGTCGTTCCGCCAAGTTCTG3'	139	Johnson e Nolan (2009)
F	RNAI/ repA	5'TGATCGTTAAGGAATTTG3' 5'GAAGATCAGTCACACCATCC3'	270	Johnson e Nolan (2009)
X	ori	5'AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT3' 5'TGAGAGTCAATTTATCTCATGTTTAGC3'	376	Johnson e Nolan (2009)
HI1	parA - parB	5'GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC3' 5'TGCCGTTCACCTCGTGAGTA3'	471	Johnson e Nolan (2009)
N	repA	5'GTCTAACGAGCTTACCGAAG3' 5'GTTTCAACTCTGCCAAGTTC3'	559	Johnson e Nolan (2009)
HI2	Iterons	5'TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC3' 5'GGCTCACTACCGTTGTCATCCT3'	644	Johnson e Nolan (2009)
L/M	repABC	5'GGATGAAAACATATCAGCATCTGAAG3' 5'CTGCAGGGCGATTCTTAGG3'	785	Johnson e Nolan (2009)