



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

---

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA E PERFIL  
DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE AMBIENTES  
DE ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS DE BOVINOS E DE AVES NO ESTADO DO  
GOIÁS E DISTRITO FEDERAL**

**JOANA MARCHESINI PALMA**

**TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA – DF  
SETEMBRO – 2020**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA E PERFIL  
DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE AMBIENTES  
DE ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS DE BOVINOS E DE AVES NO ESTADO DO  
GOIÁS E DISTRITO FEDERAL**

**JOANA MARCHESINI PALMA**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> ANGELA PATRÍCIA SANTANA**

**TESE DE DOUTORADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MEDICINA PREVENTIVA E PATOLOGIA  
VETERINÁRIA**

**PUBLICAÇÃO: 18 / 2020**

**BRASÍLIA / DF  
SETEMBRO / 2020**

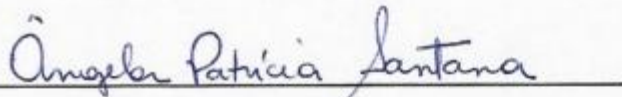
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE AMBIENTES DE ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS DE BOVINOS E DE AVES NO ESTADO DO GOIÁS E DISTRITO FEDERAL**

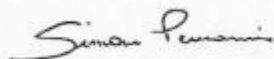
**JOANA MARCHESINI PALMA**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM SAÚDE ANIMAL**

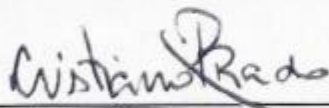
**APROVADA POR:**



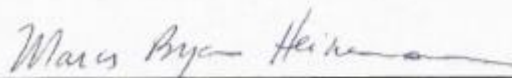
**ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, Profª. Drª. (Universidade de Brasília - UnB)  
(ORIENTADORA)**



**SIMONE PERECMANIS, Profª. Drª (Universidade de Brasília - UnB)  
(EXAMINADOR INTERNO)**



**CRISTIANO SALES PRADO, Prof. Dr. (Universidade Federal de Goiás - UFG)  
(EXAMINADOR EXTERNO)**



**MARCOS BRYAN HEINEMANN, Prof. Dr. (Universidade de São Paulo - USP)  
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**BRASÍLIA/DF, 30 DE SETEMBRO DE 2020**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

PALMA, J. M. **Detecção e caracterização de marcadores de virulência e perfil de resistência antimicrobiana em *Escherichia coli* isoladas de ambientes de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves no Estado do Goiás e Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020, 79 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, que foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. A autora reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Md Marchesini Palma, Joana  
Detecção e caracterização de marcadores de virulência e perfil de resistência antimicrobiana em *Escherichia coli* isoladas de ambientes de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves no Estado do Goiás e Distrito Federal / Joana Marchesini Palma; orientador Ângela Patrícia Santana. -- Brasília, 2020.  
79 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Saúde Animal) -- Universidade de Brasília, 2020.

1. Bactéria Gram negativa. 2. Enterobacteriaceae. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. PCR. 5. Antibiograma. I. Patrícia Santana, Ângela, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus filhos Gael e Lucca que me mostraram um amor nunca antes visto.

Aos meus pais, Ernani Palma e Paola Marchesini, que são meu maior orgulho e me mostram diariamente mesmo que longe o melhor da vida. Vocês são meu apoio diário e maior fonte inspiradora. Não tenho palavras para agradecer a tudo que vocês dois já fizeram por mim. MUITO OBRIGADA.

Agradeço aos meus dois irmãos e melhores amigos, Gabriel Marchesini Palma e Lucas Marchesini Palma, por sempre estarem ao meu lado independentemente de onde eu estiver. Vocês são minha alegria diária.

As minhas amigas de longa data que são minha base e apoio aqui em Brasília, Beatriz Gomes, Raissa Santos, Mariana Menezes, Luiza Torquato, Ligia Teixeira, Julia Testa e Marina Arêas.

As minhas queridas e amadas companheiras de profissão e de vida Nina Caniello, Camilla Becon, Thais Chiozzini, Anne Barbosa e Juliana Sarquis.

Ao meu amor, André Oliveira, por me apoiar e incentivar nas melhores e piores horas.

A minhas queridas e amadas companheiras de laboratório e sala do LAMAL, Emília e Rebecca, pela conversa e presença diária. A ajuda de vocês foi de extrema importância.

Agradeço a todos os membros do LAMAL. O dia a dia era muito mais alegre com a presença de vocês.

Agradeço à professora Ângela Patrícia pelos anos de orientação, paciência e confiança.

Ao Programa de Pós Graduação em Saúde Animal pela oportunidade de cursar o doutorado.

Agradeço a CAPES e ao Decanato de Pós Graduação pelo auxílio financeiro que viabilizaram esse projeto.

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 Perfil de resistência antimicrobiana em 63 isolados de *E. coli*, oriundos de ambiente e utensílios de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF), realizados a partir dos testes de difusão em disco (CLSI, 2020).....32

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 Resultado da pesquisa por PCR do gene *Eae* nos isolados de *E. coli*. Números 1 e 9: marcador DNA Ladder 100 bp (Invitrogen®); Número 5: isolado B2 oriundo do ralo da sala de abate do abatedouro de bovinos do DF; Número 11: isolado A56 oriundo da esteira de cortes de carcaça de frango no abatedouro frigorífico localizado no Estado do Goiás. Ambos amplificaram o gene *Eae* (570pb); Números: 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15 e 16 isolados com a PCR negativos para detecção do gene *Eae*. Visualização em gel de agarose 2% em transiluminador (Major Science®).....31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 Pesquisa e identificação de <i>Escherichia coli</i> a partir de <i>swabs</i> de arrastes nas instalações/ ambientes de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).....	18
Tabela 02 Pesquisa e identificação de <i>Escherichia coli</i> nos Equipamentos e Utensílios a partir de <i>swabs</i> de arrastes de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).....	19
Tabela 03 Pesquisa e identificação de <i>Escherichia coli</i> a partir de <i>swabs</i> de arrastes nas instalações/ ambientes de abatedouros frigoríficos de aves localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).....	22
Tabela 04 Pesquisa e identificação de <i>Escherichia coli</i> em equipamentos e utensílios a partir de <i>swabs</i> de arrastes de abatedouros frigoríficos de aves localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).....	23
Tabela 05 Detecção de genes de marcadores de virulência em isolados de <i>Escherichia coli</i> oriundos de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves, localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).....	26
Tabela 06 Locais de isolamento de <i>E. coli</i> com genes de virulência em plantas de processamento de abatedouros Frigoríficos de bovinos e de aves localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).....	27
Tabela 07 Resultado da presença de genes de resistência aos antimicrobianos em 63 isolados de <i>E. coli</i> , isoladas de ambiente e utensílios de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).....	35
Tabela 08 Resultados individuais, por isolado, de detecção dos marcadores gênicos de virulência, dos genes de resistência antimicrobiana e do antibiograma, obtidos dos abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).....	37



Tabela 09 Resultados individuais, por isolado, de detecção dos marcadores gênicos de virulência, dos genes de resistência antimicrobiana e do antibiograma, obtidos dos abatedouros frigoríficos de aves localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).....	40
Tabela 10 Análises do sequenciamento completo do genoma (WSG) dos isolados de <i>E. coli</i> oriundos de ambientes e utensílios de abatedouros frigoríficos bovinos e de aves localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).....	46
Tabela 11 Resultados do teste de capacidade de formação de biofilmes <i>in vitro</i> , em microplaca de poliestireno, dos 5 isolados de <i>E. coli</i> oriundos de ambientes e utensílios de abatedouros frigoríficos bovinos e de aves localizados no Distrito Federal (DF) e Estado de Goiás (GO).....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EHEC	<i>Escherichia coli</i> entero-hemorrágica
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de Shiga like toxina,
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderentes
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
MNEC	<i>Escherichia coli</i> associada à meningite
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária
TEC	Toneladas Equivalente Carcaça
APPCC	Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RDC	Resolução da diretoria colegiada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
LAMAL	Laboratório de Microbiologia dos Alimentos
APT	Água Peptonada Tamponada
EMB	Ágar Eosina Azul de Metileno
VM / VP	Prova de vermelho de metila / Prova de Voges- Proskauer
UFF	Universidade Federal Fluminense
EAE	Intimina
STX 1	Shiga like toxina do tipo 1
STX 2	Shiga like toxina do tipo 2
TIR	Intimina translocado
SAA	Adesina autoaglutinante
WSG	Sequenciamento completo do genoma
BHI	Caldo <i>Broth Heart Infusion</i>
TSB	Caldo <i>Triple Soy</i>
PPHO	Procedimentos padrão de higiene operacional
BPF	Boas práticas de fabricação
A/E	<i>Attaching-and-effacing</i>

## SUMÁRIO

1. RESUMO .....	1
2. ABSTRACT .....	2
3. INTRODUÇÃO .....	3
4. OBJETIVOS .....	7
4.1. OBJETIVO GERAL .....	7
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	7
5. JUSTIFICATIVA .....	8
6. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
6.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS .....	10
6.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> .....	11
6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	11
6.4 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DE <i>Escherichia coli</i> .....	11
6.5 PESQUISA DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA POR PCR .....	12
6.6 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA DE ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> .....	14
6.7 ANTIBIOGRAMA DOS ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> .....	14
6.8 PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA POR PCR .....	15
6.9 TESTE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME <i>IN VITRO</i> .....	17
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
7.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> EM ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS DE BOVINOS .....	18
7.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> EM ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS DE AVES .....	22
7.3 IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	26
7.4 RESULTADO DO ANTIBIOGRAMA DOS ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> ORIUNDOS DE ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS DE BOVINOS E DE AVES LOCALIZADOS NO ESTADO DE GOIÁS (GO) E DISTRITO FEDERAL (DF) .....	32
7.5 RESULTADO DA PESQUISA DE GENE DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> ORIUNDOS DE ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS DE BOVINOS E DE AVES LOCALIZADOS NO ESTADO DE GOIÁS (GO) E DISTRITO FEDERAL (DF) .....	35
7.6 ANÁLISES DOS ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> PARA DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA, GENES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANAS E ANTIBIOGRAMA OBTIDOS DE ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS DE BOVINOS E DE AVES LOCALIZADOS NO ESTADO DE GOIÁS (GO) E DISTRITO FEDERAL (DF) .....	37
7.7 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA DE ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> .....	45

7.8 PESQUISA DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME <i>IN VITRO</i> DE ISOLADOS DE <i>Escherichia coli</i> .....	50
8. CONCLUSÕES .....	52
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## 1. RESUMO

Este estudo teve como objetivo detectar *Escherichia coli*, em ambientes de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves, localizados em Goiás e no Distrito Federal, bem como promover a pesquisa dos genes marcadores de virulência e de resistência antimicrobiana, caracterizar a resistência fenotípica por realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos, verificar a capacidade de formação de biofilmes *in vitro* e o sequenciamento total do genoma em isolados de *Escherichia coli*. Foram analisados um total de 193 amostras de *swabs* de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves entre os meses de agosto de 2017 e agosto de 2018. Dentre essas, 74 amostras de *swabs* oriundas de abatedouro frigoríficos de bovinos e 121 de aves. Foram detectados um total de 63 isolados de *Escherichia coli*, 19 oriundas de abatedouro frigoríficos de bovino e 44 de aves. Em instalações e em equipamentos em abatedouros de bovinos, a *E. coli* foi encontrada em maior frequência em ralos de sala de abate (38%) e em caixas plásticas brancas (42,9%). Nos abatedouros frigoríficos de aves esta bactéria foi detectada em maior quantidade nos ralos da área limpa na sala de abate (45,8%), e em esteiras de cortes de frango (72,2%). Foram detectados nos isolados de *E. coli* oriundas de abatedouros frigoríficos de aves e de bovinos os genes codificadores de marcadores de virulência *Stx* 1 (23,8%), *Hly* (9,5%), *Saa* (3,2%), *Eae* (4,8%) e *Tir*  $\beta$  (3,2%). Todas os 63 isolados foram resistentes ao antimicrobiano Vancomicina e Teicoplanina. Em abatedouros frigoríficos de bovinos os isolados de *E. coli* apresentaram uma maior resistência a Eritromicina (63,2%), Cefazolina (26,3%) e Sulfonamidas (26,3%). Nos isolados de abatedouros frigoríficos de aves os isolados de *E. coli* foram resistentes ao Ácido nalidíxico (70,5%), Eritromicina (52,3%) Sulfonamidas (43,2%). Os isolados de *E. coli* oriundos de abatedouros frigoríficos de bovino obtiveram uma presença de genes de resistência aos antimicrobianos *Amp*(C) de 63,2%, *Tet* (B) com 52,6%, *Sul* 1 com (15,8%), *Cmla* com 5,3%, *Aac*(3)-I com 5,3% e *Tet* (A) com 5,3% s. Para os de aves o resultado foi *Amp*(C) (70,5%), *Tet* (B) (34,1%), *Tet* (A) (29,5%), *Sul* 1 (25%), *Cmla* (18,2%), *Aac*(3)-I (9,1%). O sequenciamento completo do genoma dos isolados B2, A56 e A64 permitiu descrever pela primeira vez na região os sorotipos O177:H28 e O71:H48 e observou-se uma capacidade de formação de biofilme fraca em dois dos cinco isolados testados.

## 2. ABSTRACT

The aim of this work was to detect *Escherichia coli*, in environments of slaughterhouses for cattle and poultry, located at the Goiás and Federal District areas, as detect virulence and antimicrobial resistance genes, and characterize phenotypic resistance by performing antibiograms, to verify the capacity of biofilm formation in vitro and the total genome sequencing in *E. coli* isolates. A total of 193 swab samples from slaughterhouses for cattle and poultry were analyzed between August 2017 and August 2018. Among these, 74 swab samples from beef slaughterhouses and 121 from poultry. A total of 63 isolates of *E. coli* were detected, 19 from beef slaughterhouses and 44 from poultry. In facilities and equipment in cattle slaughterhouses, *E. coli* was found more frequently in slaughter room drains (38%) and in white plastic boxes (42.9%). In the poultry slaughterhouses, this bacterium was detected in greater quantity in the drains of the clean area at the slaughter room (45.8%), and in the belts of chicken-cutting area (72.2%). The genes encoding virulence markers were, *Stx 1* (23,8%), *Hyla* (9,5%), *Saa* (3.2%), *Eae* (4.8%) and *Tir*  $\beta$  (3,2%), detected in *E. coli* isolates from both slaughterhouses. All 63 isolates were resistant to the antimicrobial Vancomycin and Teicoplanin. In bovine slaughterhouses, *E. coli* isolates showed greater resistance to Erythromycin (63.2%), Cefazolin (26.3%) and Sulphonamides (26.3%). In poultry slaughterhouses isolates, they were resistant to Nalidixic acid (70.5%), Erythromycin (52.3%) Sulphonamides (43.2%). *E. coli* isolates from bovine slaughterhouses obtained a presence of antimicrobial resistance genes from *Amp* (C) of 63.2%, *Tet* (B) with 52.6%, *Sul 1* with (15.8%), *Cmla* with 5.3%, *Aac*(3) -I with 5.3% and *Tet* (A) with 5.3%. For poultry the result was *Amp* (C) with 70.5%, *Tet* (B) (34.1%), *Tet* (A) (29.5%), *Sul 1* (25%), *Cmla* (18, 2%), *Aac*(3)-I (9.1%). The complete genome sequencing of B2, A56 and A64, allowed the description of serotypes O177: H28 and O71: H48, those were described for first time in this region. A weak biofilm formation capacity was observed in two of the five isolates tested.

### 3. INTRODUÇÃO

O Gênero *Escherichia* compreende seis diferentes espécies, das quais fazem parte a *Escherichia coli*, *Escherichia albertii*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia vulneris*, *Escherichia blattae* e *Escherichia hermanii* (GARRITY et al., 2004). A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa, em forma de bacilo, anaeróbia facultativa, pois possui metabolismo respiratório e fermentativo, não-esporulado, que realiza a fermentação da glicose, com a produção de ácido lático e gás carbônico (CAPRIOLI et al., 2005; BARDIAU et al., 2010). A *E. coli* coloniza normalmente o trato gastrointestinal de diferentes mamíferos e aves. Geralmente a bactéria e o hospedeiro coabitam em benefício mútuo (KAPER et al., 2004). *E. coli* comensais raramente causam doenças. Entretanto, podem levar à doença em hospedeiros imunocomprometidos ou em que as barreiras gastrointestinais normais são rompidas (KAPER et al., 2004).

Existem diferentes isolados de *E. coli* altamente adaptados que adquiriram fatores de virulências específicos, que conferem uma maior capacidade de adaptação, e permitem que elas causem diferentes tipos de doenças nos hospedeiros (KAPER et al., 2004). Esses genes de virulências são frequentemente codificados em elementos genéticos móveis que podem ser transferidos entre diferentes cepas, criando assim novas combinações de fatores de virulência (KAPER et al., 2004). Devido a isso ela é reconhecida como um importante patógeno zoonótico de origem alimentar com risco potencial para a saúde pública (FERNÁNDEZ et al., 2012)

As cepas de *E. coli* patogênicas foram categorizadas em dois grupos de patogenicidade com base em suas propriedades de virulência (NATARO & KAPER, 1998). O primeiro grupo está entre os patógenos intestinais e subdivide-se em seis categorias da *E. coli*: enteropatogênica (EPEC) que tem como principal característica causar a lesão “attaching and effacing” (A/E) e os principais genes estão inseridos em uma ilha de patogenicidade denominada LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), como o gene da Intimina (*Eae*) (COURA et al. 2014). Entero-hemorrágica (EHEC) que inclui a *E. coli* (STEC), produtoras de enterotoxinas termoestáveis e termolábeis (COURA et al., 2014). Enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC), difusamente aderentes (DAEC) (NATARO & KAPER, 1998). O segundo grupo está relacionado com as infecções por *E. coli* extraintestinais como a *E. coli* uropatogênica (UPEC) e a *E. coli* associada à meningite (MNEC) responsável pela meningite e sepse (RUSSO & JOHNSON, 2000). A *E. coli* patogênica aviária (APEC) é conhecida por promover infecções extra-intestinais e podem causar principalmente infecções respiratórias, pericardite e septicemia nestes animais (RUSSO & JOHNSON, 2000). Mais recentemente a *E. coli* enteroaderente foi implicada na doença de Crohn, e foi considerada um patótipo adicional (CROXEN et al., 2013).

A produção mundial de carne bovina vem crescendo a uma taxa anual de 0,64%, passando de cerca de 58,5 milhões de toneladas em 2009 para 62,8 milhões de toneladas em 2018 (IPEA, 2019). Neste contexto, o Brasil é o segundo maior produtor com 14,8% da produção total em 2019 e é considerado o principal país exportador de carne, com uma participação de 23,67% das exportações mundiais em 2019 (ABIEC, 2020). De acordo com a ABIEC (2020), o Brasil possuía em 2019 um rebanho bovino de 213,68 milhões de cabeças, registrando 43,3 milhões de abates. Entre 2018 e 2019, o Brasil registrou um aumento de 12,2% nas exportações de carne bovina, passando de 2,21 milhões Toneladas Equivalente Carcaça (TEC) para 2,49 milhões TEC. Segundo a ABIEC (2020), em 2019 o Brasil exportou 2,49 milhões TEC (23,6% do total de carne produzida), enquanto 8,01 milhões TEC (76,3%) tiveram como destino o mercado interno.

Além da carne bovina, o Brasil é o terceiro maior produtor e o primeiro exportador mundial de carne de frango, com uma produção de 13,25 milhões de toneladas em 2019 (ABPA, 2020). O estado do Goiás foi responsável por 8,11% do total dos abates de frangos no país em 2019, enquanto o Distrito Federal totalizou 0,11% destes abates (ABPA, 2020). Vale ressaltar que 68% da produção de carne de frango do Brasil é destinada ao consumo interno e os 32% restantes são exportados (ABPA, 2020), tornado este setor de grande importância econômica para o país.

Em função da enorme relevância econômica e por questões de saúde pública, as indústrias de carnes investem grandes recursos para garantir a qualidade de seus produtos (TSOLA et al., 2008). Um Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) bem estruturado e desenvolvido adequadamente evita ou minimiza os riscos à segurança dos alimentos dentro da indústria de carnes (TOMPKIN, 1994). Surak (2002) relatou que os microrganismos encontrados em abatedouros frigoríficos de aves, como a *E. coli*, podem ter origens de duas fontes principais: o ambiente da indústria (aves vivas, equipamentos e trabalhador) e o sistema digestivo dos animais durante a evisceração. Nos abatedouros frigoríficos a contaminação das carcaças de bovinos pode ocorrer em diferentes estágios durante todo o processamento, e geralmente pode ser causada pela formação de biofilmes ou pela presença de *E. coli* nas superfícies de equipamentos e ambientes associados ao abate e processamento (VOGELEER et al., 2014). Segundo Borch & Arinder (2002) esta contaminação, tanto em frigoríficos de aves quanto nos de bovinos, é denominada de contaminação cruzada e ocorre quando a carcaça ou a carne entra em contato com superfícies contaminadas de equipamentos, instalações e manipuladores.

A presença de *E. coli* em biofilmes, ambientes ou em superfícies que entram em contato com os alimentos e/ou suas matérias primas podem causar problemas de ordem higiênico-sanitários (CHAVANT et al., 2007; SHI & ZHU, 2009). Assim, a *E. coli* representa um agente etiológico de infecções humanas e animais, podendo promover a disseminação da contaminação na indústria e no



produto final (CHAVANT et al., 2007). No Brasil são poucos os estudos que relataram a presença desta bactéria em ambientes industriais produtoras de carnes e derivados. Nespolo et al. (2014) descreveram a presença de *E. coli* na água de abastecimento industrial, de superfícies de mãos dos manipuladores, facas e em diferentes pontos de carcaças em um abatedouro frigorífico de bovino, localizado na cidade de São Paulo. Ferreira & Sobrinho (2003) avaliaram a qualidade bacteriológica de frigoríficos no município de São Luís, no estado do Maranhão. Rodrigues et al. (2010) relataram e quantificaram a produção de biofilme pela *E. coli* na sala de corte em um matadouro de aves na região sul do Brasil. Na região do Distrito Federal e do estado de Goiás, a presença desta bactéria foi relatada em carcaças de bovinos (FILHO et al., 2006; SANTOS et al., 2017) e em aves (MINHARRO et al., 2001). No entanto, não existem estudos mais aprofundados relacionados à presença de *E. coli* em ambientes de abatedouros frigoríficos nesta região.

Desta forma, com o objetivo de promover o monitoramento do controle da presença de microrganismos patogênicos nos abatedouros frigoríficos, as indústrias e governo têm implantado nos últimos anos programas de autocontrole, tais como a Portaria n° 368, de 4 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a portaria n° 368 de 4 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) que aprova o regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. A Portaria n° 46, de 10 de fevereiro de 1998, que institui o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e a ISO 22000 que se refere as normas relacionadas à segurança de alimentos. Mais recentemente com a Instrução Normativa n° 60, de 2018, ficou estabelecido o controle microbiológico em carcaça de suínos e em carcaça de carne de bovinos em abatedouros frigoríficos, registrados no Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também instituiu com a Resolução da diretoria colegiada - RDC n° 331, de 23 de dezembro de 2019, os padrões microbiológicos de alimentos e suas devidas aplicações. A ANVISA publicou ainda de maneira complementar à RDC 331 a Instrução Normativa n° 60, de 23 de dezembro de 2019, estabelecendo as listas de padrões microbiológicos para alimentos prontos comercializados ao consumidor.

A presença de *E. coli* em abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves pode representar um risco para a saúde humana e dos animais, decorrente da patogenicidade ocasionada pela presença de diferentes fatores de virulência (KAPER et al., 2004). Esta bactéria pode ocasionar desde uma simples diarreia à colite hemorrágica e ainda síndrome urêmica hemolítica (STROMBERG et al., 2018).

Um outro fator importante, relacionado à presença desta bactéria em ambientes de abatedouros frigoríficos é a possibilidade de apresentar perfil de multirresistência a antimicrobianos, que por sua vez pode alcançar o homem via o consumo de alimentos contaminados por este

microrganismo (VAN DEN BOGAARD et al., 2001). A resistência bacteriana pode ocorrer por meios naturais ou adquiridos (SPINOSA & TÁRRAGA, 2017), por mutações aleatórias ou por transferência de genes de resistência de uma bactéria para outra (SPINOSA & TÁRRAGA, 2017). Essa transferência é denominada de transferência horizontal de genes, e é o mecanismo de resistência mais comum, sendo os microrganismos ambientais fontes primárias desses genes de resistência (AARESTRUP et al., 2008). Apesar das evidências de que esta resistência é um fenômeno natural (BHULLAR et al., 2012; BUTAYE et al., 2015) e que se relaciona à adaptação dos microrganismos às condições ambientais, houve exacerbação de sua ocorrência devido ao uso desenfreado e inapropriado de antimicrobianos (FAO, 2016).

Considerando o importante papel da *E. coli* na saúde pública e os poucos estudos relacionados a este microrganismo nas regiões do Distrito Federal e Goiás em indústrias produtoras de carnes, este trabalho objetivou identificar a presença desta bactéria em ambientes de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves localizados nestas duas regiões. Além disto, foram analisados os genes marcadores de virulência, genes de resistência antimicrobiana, antibiograma, o sequenciamento total do genoma de alguns isolados e verificado a capacidade de formação de biofilme *in vitro* de alguns isolados.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Pesquisar e quantificar estirpes de *Escherichia coli* isoladas de ambientes de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves, localizados no Distrito Federal e Goiás.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a presença de genes marcadores virulência nos isolados de *E. coli*;
- Caracterizar a resistência antimicrobiana nos isolados de *E. coli*;
- Realizar antibiograma nos isolados de *E. coli*;
- Realizar o sequenciamento total do genoma em alguns isolados de *E. coli*;
- Pesquisar a formação de biofilme *in vitro* em alguns isolados de *E. coli*.

## 5. JUSTIFICATIVA

A *E. coli* geralmente permanece inofensivamente confinada ao lúmen intestinal, mais precisamente na mucosa do cólon (NATARO & KAPER, 1998). Entretanto, no hospedeiro algumas cepas consideradas não patogênicas podem causar infecção ao adquirirem ou expressarem genes de virulência presentes em seu genoma (NATARO & KAPER, 1998; STENUTZ et al., 2006). Neste contexto a *E. coli* que não adquirir elementos genéticos que codificam fatores de virulência, permanecerão como bactérias comensais benignas (STENUTZ et al., 2006). Esses fatores de virulência são frequentemente codificados em elementos genéticos móveis que podem migrar entre diferentes cepas para criar novas combinações de fatores de virulência, ou em elementos genéticos que poderiam ter sido móveis, mas que agora evoluíram para se tornarem fixos no genoma (KAPER et al., 2004). O monitoramento de rotina dos abatedouros frigoríficos para presença dessa bactéria é crucial para se obter alimentos seguros para o consumo (PARVEJ et al., 2018). A Instrução Normativa Nº 60 promulgada pelo MAPA em 2018, tem sido amplamente utilizada, visando a detecção de *E. coli* produtora de Shiga like toxina. Esta Instrução Normativa estabelece a obrigatoriedade do controle microbiológico em carcaças e carnes de bovinos em abatedouros frigoríficos, registrados no Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) (BRASIL, 2018).

Devido à importância das cepas patogênicas de *E. coli* para a saúde animal e humana, justifica-se a pesquisa desse microrganismo em ambientes de abatedouros frigoríficos devido ao fato da *E. coli* já ter sido identificada como o agente causador de diferentes doenças diarreicas importantes, por possuir diferentes genes de virulência, genes de resistência aos antimicrobianos e pela capacidade de produzir toxinas de importância para saúde pública (NATARO & KAPER, 1998; CAPRIOLI et al., 2005). As cepas de *E. coli* envolvidas em doenças diarreicas podem adquirir, através da transferência gênica horizontal, de um conjunto particular de genes que persistiram com sucesso no hospedeiro (NATARO & KAPER, 1998; KAPER et al., 2004).

A plasticidade genômica da *E. coli* é bastante importante, comprovada pela variedade de cepas, variando de comensais do trato gastrointestinal à diversos patógenos capazes de promover doenças intestinais, ou extras intestinais graves com diferentes consequências clínicas (GOMES et al., 2016). Sendo um risco para a saúde humana e para os animais, esta doença é decorrente da patogenicidade ocasionada pela presença de diferentes genes de virulência, como por exemplo *Stx 1*, *Stx 2*, *Eae* e *Tir* (KAPER et al., 2004). A plasticidade genômica da *E. coli* pode causar desde uma simples diarreia até colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (ZACHARY et al., 2018). Apenas as combinações mais bem-sucedidas de fatores de virulência que persistiram e se tornarão específicas variantes de *E. coli*, levando assim a doença em indivíduos saudáveis (KAPER et al.,

2004). Três síndromes podem resultar da infecção por um dessas variantes: doença entérica / diarreica, infecções do trato urinário e sepse/meningite (KAPER et al., 2004).

A resistência antimicrobiana desse microrganismo tem sido causa de aumento em taxas de mortalidade, morbidade e gastos com a saúde tanto em humanos quanto em animais (WHO, 2015). Isso exige uma constante vigilância sobre a ocorrência de resistência antimicrobiana em microrganismos cuja contaminação ocorra via alimentos (WHO, 2015). Desta forma, a *E. coli* pode prover informações importantes sobre o fluxo de resistência na cadeia produtiva de alimentos, já que ela é um microrganismo comumente isolado, possui linhagens patogênicas, além de seu papel como reservatório de genes de resistência e genes de virulência, que podem ser transferidos para outros patógenos (WHO, 2015).

Até o presente momento não existem estudos sobre a presença deste patógeno em plantas de processamento de abatedouros frigoríficos na região do Distrito Federal e do estado de Goiás, levando a uma ausência de informações sobre possíveis cepas que apresentem genes importantes de virulência, e cepas resistentes a múltiplas drogas antimicrobianas.

Levando-se em consideração a importância de verificação da presença de *E. coli* em ambientes de abatedouros frigoríficos, e a ausência de estudos da presença de marcadores de virulência e resistência oriundas deste microrganismo neste tipo de ambiente, este trabalho teve por objetivos verificar a presença de genes de virulência e de resistência antimicrobiana por Reação em cadeia da polimerase (PCR), realizar o antibiograma, realizar o sequenciamento total do genoma em alguns isolados de *E. coli*, pesquisar a formação de biofilme *in vitro* em alguns isolados de *E. coli* oriundas de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves, localizados na região do Distrito Federal e do Estado de Goiás.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS

A pesquisa de *Escherichia coli* foi realizada por meio da utilização de *swabs* (Labor *swab* ®) esterilizados, pelo método de arraste em superfícies com *swabs*, embebidos em solução de transporte composto por água peptonada 0,1%, utilizando-se moldes estéreis de dimensões de 30 cm<sup>2</sup>, tal qual o protocolo descrito por Barros et al. (2007).

Os pontos de coletas de amostras selecionados foram subdivididos em instalações/ ambientes e equipamentos/utensílios. Nas instalações dos abatedouros frigoríficos de bovinos os pontos de coletas foram os ralos, as paredes das câmaras frias de resfriamento das carcaças, e paredes em diferentes pontos da sala de abate tais como a área de evisceração, salas de miúdos, área de inspeção das carcaças e miúdos comestíveis, na área de lavagem das carcaças, nas tubulações de aço inox (chutes) de passagem de miúdos comestíveis e mocotós e também de descarte de materiais não comestíveis. Nos abatedouros frigoríficos de aves foram coletados *swabs* nas tubulações de aço inox (chutes) de passagem dos cortes das carcaças de frango, os de carne mecanicamente separada e os direcionadores de resíduos não comestíveis.

Os pontos selecionados dos equipamentos/utensílios para coleta nos abatedouros frigoríficos de bovinos foram as esteiras, mesas de aço inox de inspeção de vísceras, mesas de aço inox de resíduos retirados das carcaças inspecionadas, ganchos de pendura de cabeça/carcaça e caixas plásticas de cores brancas. Em relação aos equipamentos/utensílios de abatedouros frigoríficos de aves foram realizadas amostras de *swabs* nas mesas de aço inox de inspeção de vísceras, mesas de aço inox de resíduos retirados das carcaças inspecionadas, esteiras de cortes de frangos presente na sala de abate, maquinários tais como máquinas de lavagem de moela, fígado e coração localizados na área limpa da sala de abate e ganchos de pendura de cabeça/carcaça.

As coletas foram previamente combinadas com os responsáveis pelas indústrias, que por sua vez aceitaram participar espontaneamente desta pesquisa. O número de *swabs* foi realizado conforme as condições oferecidas pela empresa no dia da coleta, em relação ao local e à quantidade que poderia ser realizada. No entanto tentou-se padronizar ao máximo os locais/ pontos de coleta e quantidades de *swabs*. Cada *swab* foi considerado uma amostra. As amostras foram coletadas antes do início das atividades diárias, e antes dos procedimentos de higienização pré-abate das indústrias.

Participaram desta pesquisa cinco (5) estabelecimentos: 2 abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no estado do Goiás e no Distrito Federal e 3 de abatedouros frigoríficos de aves, sendo 1 localizado no estado de Goiás e 2 no Distrito Federal. Os abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no estado de Goiás e no Distrito Federal foram designados por B1 e B2, respectivamente.

As indústrias de aves localizadas no Distrito Federal foram designadas por A1, e A3 e aquela situada no estado de Goiás por A2. Ao todo foram realizadas oito coletas de amostras em todos os estabelecimentos. Realizou-se coletas de amostras por duas vezes em diferentes dias nas indústrias A1, A2 e B2. As amostras das indústrias A3 e B1 foram coletadas uma única vez.

Foram coletadas 74 amostras de *swabs* nos abatedouros frigoríficos de bovinos, sendo 34 no abatedouro frigorífico B1, e 40 no abatedouro B2. Em relação às indústrias de aves foram coletadas 121 amostras de *swabs* (A1, A2 e A3), sendo 40 no abatedouro frigorífico A1, 50 *swabs* na indústria A2 e 31 no A3. No total foram obtidas 193 amostras de *swabs* em abatedouros de aves e bovinos. Todas as amostras foram obtidas entre o os meses de agosto de 2017 e agosto de 2018

Todas as indústrias apresentavam Serviço de Inspeção Oficial. Após as coletas dos *swabs*, os mesmos foram acondicionados em caixas isotérmicas e foram transportadas até o Laboratório de Microbiologia dos Alimentos (LAMAL) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, para processamento.

## 6.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli*

Para o isolamento e identificação do microrganismo *Escherichia coli* foram utilizados os procedimentos descritos por Siqueira (1995). Os *swabs* utilizados nas coletas foram incubados em 9 mL de Água Peptonada Tamponada 1% (APT) (Acumedia®) como meio de pré-enriquecimento durante 24 horas, em estufas bacteriológicas (Quimis ®), sob a temperatura de 37°C. Após a incubação, o *swab* foi semeado em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (Acumedia®) e incubadas em temperatura de 35 °C por 24 horas, em estufas bacteriológicas (Quimis ®), observando desta foram o desenvolvimento de colônias típicas (pretas-azuladas com reflexo verde metalizado) característicos de *E. coli*. As colônias consideradas típicas Gram negativas e oxidase negativas foram submetidas às provas bioquímicas de Citrato Simmons, Indol, Teste de vermelho de metila (VM) e Voges- Proskauer (VP) seguindo o protocolo preconizado por Feng et al. (2002) para a confirmação do microrganismo *Escherichia coli*.

## 6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística utilizada foi a de um estudo observacional descritivo de ocorrência (BLOCH & COUTINHO, 2003).

## 6.4 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DE *Escherichia coli*

A extração do DNA total dos isolados de *E. coli* foram realizadas por método de fervura seguindo o protocolo realizado por Carvalho et al. (2016), em que as colônias foram inicialmente inoculadas em 3 mL de caldo BHI (brain heart infusion) (Acumedia®) e incubadas em estufas bacteriológicas (Quimis ®) por 24 h em temperatura de 37 ° C. Após esse período foi retirado 1 mL deste cultivo e transferido para tubos tipo *Eppendorf* estéreis, em que foram centrifugados (Novatecnica®) por 10 min a 12.000g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 200 µL de água Milli-Q estéril. Após a homogeneização, a amostra foi fervida por 10 minutos e posteriormente resfriado em gelo por 5 min. A quantificação do DNA extraído foi realizado pelo uso de marcadores High Mass (Invitrogen) e a quantidade utilizada nas reações da PCR, como DNA amostral, foram de aproximadamente 10ng de DNA por amostra.

## 6.5 PESQUISA DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA POR PCR

Para a pesquisa dos 12 diferentes marcadores de virulência da *Escherichia coli* foram realizadas reações de PCR utilizando *primers* específicos e programas adequados para cada gene. Os marcadores de virulência foram selecionados de acordo com a capacidade de provocar lesões no organismo hospedeiro conforme relatados por Caprioli et al. (2005) e por Kaper et al. (2004). Os controles positivos utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pela Prof. Dra Alice Gonçalves Martins Gonzalez, responsável pelo laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal Fluminense (UFF).

Para a pesquisa dos genes da Intimina (*Eae*), Shiga like toxina do tipo 1 (*Stx 1*), Shiga like toxina do tipo 2 (*Stx 2*) por PCR foram utilizados os procedimentos descritos por China et al. (1996). Para a pesquisa dos diferentes subtipos da Shiga like toxina tipo 2, os subtipos *Stx 2: stx2c, stx2d, stx2e* e *stx2f*, foi utilizado o protocolo descrito por Wang et al. (2002). As variantes do gene do receptor de intimina translocado TIR [ $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta) e  $\gamma$  (gama)] foram realizados de acordo com China et al. (1999) (Quadro 01). O gene de virulência da hemolisina (*E-hlyA*) por Paton e Paton (1998) e o gene adesina autoaglutinante (*Saa*) foram detectados conforme o protocolo descrito por Paton e Paton (2002). As reações eram compostas por um volume final de 25µl, contendo tampão 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl - Phoneutria®), 2,0mM de dNTPs, 2U de taq DNA polimerase (Phoneutria®), 2mM de desoxirribonucleotídeos fosfatados (Invitrogen®), 3mM de MgCl<sub>2</sub> (Phoneutria®) e *primers* nas concentrações de 1 µM. Todas as reações ocorreram em termociclador MyCycler (BioRad®) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 30 ciclos a 94°C por 0.50 minutos, temperatura de anelamento de acordo com cada primers por 0,5 minutos, e 72°C por 0,5 minutos; e um ciclo final a 72°C por 10 minutos. A lista dos *primers* e da temperatura de anelamento utilizada encontram-se descritos no Quadro 01.



Quadro 01 Lista de *primers* utilizados para detecção de genes de virulência nos isolados de *Escherichia coli* oriundos de abatedouros frigoríficos do Estado de Goiás e do Distrito Federal.

Gene/ nome	Sequências de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
Eae	F- AGGCTTCGTCACAGTTG	570	48	China et al., 1996
	R-CCATCGTCACCAGAGGA			
Stx1	F- AGAGCGATGTTACGGTTTG	388	50	China et al., 1996
	R- TTGCCCCCAGAGTGGATG			
Stx2	F- TGGGTTTTTCTTCGGTATC	807	45	China et al., 1996
	R- GACATTCTGGTTGACTCTCTT			
stx2c	F- GCGGTTTTATTTGCATTAGT	124	50	Wang et al., 2002
	R- GTACTCTTTTCCGGCCACT			
stx2d	F- GGTAATAATTGAGTTCTCTAAGTAT	175	50	Wang et al., 2002
	R- CAGCAAATCCTGAACCTGACG			
stx2e	F- ATGAAGTGTATATTGTTAAAGTGG	303	50	Wang et al., 2002
	R- AGCCACATATAAATTATTCGT			
stx2f	F- TGTCTTCAGCATCTTATGCAG	150	50	Wang et al., 2002
	R-CATGATTAATTACTGAAACAGAAA			
Tir $\alpha$	F- CGCTAACCTCCAAACCATT	781	50	China et al., 1999
	R- CRCKCCAYTACCTTCACA*			
Tir $\beta$	F- TGTATGTCGCACTCTGATT	342	50	China et al., 1999
	R- CRCKCCAYTACCTTCACA*			
Tir $\gamma$	F- GTCGGCAGTTTCAGTTTCAC	560	50	China et al., 1999
	R- CRCKCCAYTACCTTCACA*			
hlyA	F- GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534	57	Paton & Paton, 1998
	R-AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT			
Saa	F- CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	55	Paton & Paton, 2002
	R- ATGGACATGCCTGTGGCAAC			

\*R= A+G, K= T+G, Y= C+T, M= A+C. (China et al., 1999)

## 6.6 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA DE ISOLADOS DE *Escherichia coli*

O sequenciamento completo do genoma (WSG) foi realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilton Lincopan. Para este sequenciamento foram escolhidos, de forma aleatória, 03 isolados de *E. coli*.

Os protocolos utilizados para a Extração do DNA bacteriano foram os preconizados pelo Protocolo do kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies, CA) e a quantificação do DNA via Nanodrop para verificar que a concentração e as razões estavam dentro do padrão (260/230 e 260/280). Uma segunda Quantificação do DNA foi realizada utilizando Qubit® (BR) e o DNA foi diluído para uma massa final de 400 ng de acordo com o protocolo Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Illumina) formando a biblioteca. Essa biblioteca então foi novamente quantificada com o Qubit (HS) para então verificar o tamanho dos fragmentos via Bioanalyzer para realizar o Sequenciamento através da Plataforma NextSeq da Illumina.

A pesquisa de genes de virulência foi realizada via Virulencefinder – 2.0, a detecção do sorotipo foi realizada via Serotypefinder, – 2.0 o tipo de Fímbria via FimTyper 1.0.

## 6.7 ANTIBIOGRAMA DOS ISOLADOS DE *Escherichia coli*

Para a realização do antibiograma, os isolados foram cultivados em 5 mL de caldo *Broth Heart Infusion* (BHI) (Difco®) até atingirem turbidez equivalente ao padrão 0,5 na escala McFarland (Nefelobac – Probac ®). Após esse período foram realizados os testes de antibiograma para os isolados em placas contendo ágar Mueller-Hinton (Acumedia ®) de acordo com a técnica de Disco-Difusão, padronizado pelo manual do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020). As bases farmacológicas testadas foram: Quinolonas: ácido nalidíxico (NAL: 30 µg) (DME®), ciprofloxacino (CIP: 5 µg) (DME®), enrofloxacin (ENO: 5µg) (DME®). β-Lactâmicos: amoxicilina (AMX: 10µg) (DME®), ampicilina (AMP: 10 µg) (DME®). Cefalosporinas: cefalexina (CFE: 30) (DME®), cefalotina (CFL: 30µg) (DME®), cefazolina (CFZ: 30 µg) (DME®), ceftazidima (CAZ; 30 µg) (DME®). Anfenicóis: cloranfenicol (CLO:30µg) (DME®). Polimixina: colistina (COL: 10 µg) (DME®). Tetraciclina: tetraciclina (TE: 30 µg) (DME®), doxiciclina (DOX: 30 µg) (DME®). Macrolídeos: eritromicina (ERI: 15 µg) (DME®). Aminoglicosídeos: estreptomicina (EST: 10 µg) (DME®), gentamicina (GEN:10 µg) (DME®), neomicina (NEO: 30 µg) (DME®). Sulfonamida: sulfonamidas (SUL: 300µg) (DME®). Glicopeptídeos: teicoplanina (TEC: 30) (DME®), vancomicina (VA: 5 µg) (DME®). Seguindo as recomendações definidas pelo CLSI (2020) foram dispostos no máximo cinco discos de antibióticos em cada placa de ágar Mueller-Hilton e incubadas

a 37°C por 24h. Após esse período foram realizadas as medições do tamanho das zonas de inibição de crescimento bacteriano com um halômetro, sendo a cepa bacteriana classificada como resistente, intermediária e sensível, de acordo com o diâmetro da zona padrão estabelecida pelo CLSI (2020).

#### 6.8 PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA POR PCR

Nos isolados de *Escherichia coli* foram realizados a pesquisa de 14 genes de resistência a antimicrobianos, sendo eles pertencentes a 6 diferentes classes de antimicrobianos (Beta-lactâmicos, Tetraciclina, Sulfonamida, Cloranfenicol, Aminoglicosídeo e Polimixinas) os quais encontram-se descritos no Quadro 02. Estes genes foram selecionados segundo sua utilização para tratamento de infecções em humanos, como por exemplo os  $\beta$  - lactâmicos (PESSANHA & FILHO, 2001) e os de utilização na medicina veterinária, como Ciprofloxacina, Ácido Nalidíxico, Tetraciclina, Estreptomicina, Gentamicina (MANIE et al., 1998; PESSANHA & FILHO, 2001; ANVISA, 2007; ALMEIDA et al., 2012; SPINOSA et al., 2017).

As reações eram compostas por um volume final de 25 $\mu$ l, contendo tampão 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl - Phoneutria®), 2,0mM de dNTPs, 2U de taq DNA polimerase (Phoneutria®), 2mM de desoxirribonucleotídeos fosfatados (Invitrogen®), 3mM de MgCl<sub>2</sub> (Phoneutria®) e *primers* nas concentrações de 1  $\mu$ M. Todas as reações ocorreram em termociclador MyCycler (BioRad®) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 30 ciclos a 94°C por 0.50 minutos, temperatura de anelamento de acordo com cada *primer* por 0,5 minutos (Quadro 02), e 72°C por 0,5 minutos; e um ciclo final a 72°C por 10 minutos.

Em três cepas foram realizadas a detecção de genes de resistência antimicrobiana através do sequenciamento completo do genoma (WSG), via ResFinder v3.2.

Quadro 02 Lista de *primers* utilizados para detecção de genes de resistência antimicrobiana nos isolados de *Escherichia coli* oriundos de ambiente de abatedouros frigoríficos do estado de Goiás e Distrito Federal.

classe de antibiótico	Gene/ nome	Sequências de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
Beta -lactâmicos	BlaSHV	F -TCG CCT GTG TAT TAT CTC CC R- CGC AGA TAA ATC ACC ACA ATG	857	52,2	Maynard et al., 2003
	ampC	F - TTC TAT CAA MAC TGG CAR CC R- CCY TTT TAT GTA CCC AYG A	550	49	Schwartz et al., 2003
	tet(A)	F-GTG AAA CCC AAC ATA CCC C R- GAA GGC AAG CAG GAT GTA G	880	53,3	Maynard et al., 2003
	tet(B)	F- CCT TAT CAT GCC AGT CTT GC R- ACT GCC GTT TTT TCG CC	774	53,4	Maynard et al., 2003
Tetraciclina	tet(C)	F-ACT TGG AGC CAC TAT CGA C R- CAT CAA TCC ATG CCA ACC C	881	53	Maynard et al., 2003
	tet(M)	F- GTT AAA TAG TGT TCT TGG AG R- CTA AGA TAT GGC TCT AAC AA	700	49	Aarestrup et al., 2000
Sulfonamida	Sul I	F- TTC GGC ATT CTG AAT CTC AC R- ATG ATC TAA CCC TCG GTC TC	822	53	Maynard et al., 2003
	Cat I	F- AGT TGC TCA ATG TAC CTA TAA CC R- TTG TAA TTC ATT AAG CAT TCT GCC	547	52,2	Van et al., 2008
Cloranfenicol	Cmla	F: CCG CCA CGG TGT TGT TAT C R: CAC CTT GCC TGC CCA TCA TTA G	698	57	Keyes et al., 2000
	aac(3)-I	F- ACC TAC TCC CAA CAT CAG CC R- ATA TAG ATC TCA CTA CGC GC	157	54	Van et al., 2008
Polimixinas	Mcr- 1	F- CGGTCAGTCCGTTTGTTT R- CTTGGTCGGTCTGTGA	35-343	52	Liu et al., 2015
	Mcr- 2	F- TGTTGCTTGTGCCGATTGGA R- AGATGGTATTGTTGGTTGCTG	494-1060	47	Xavier et al., 2016
	Mcr- 3	F- -TTG GCACTGTATTTGCATTT R- TTAACGAAATTGGCTGGAACA	542	52	Yin et al., 2017
	Mcr- 4	F- ATTGGGATAGTCGCCTTTTT R- TTACAGCCAGAATCATTATCA	487	51	Carattoli et al., 2017

## 6.9 TESTE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO*

Neste estudo foram realizados teste de formação de biofilme em 5 diferentes isolados. A capacidade de formação de biofilme foi avaliada a partir do ensaio em microplaca de titulação de poliestireno, descrito por Djordjevic et al. (2002). Inicialmente os isolados foram cultivados em placa de petri contendo ágar Triple Soy (TSA - Acumedia®) a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica (Quimis®) e em seguida transferida para 10 mL de caldo Triple Soy sem glicose (TSB - Acumedia®) e incubado a 37°C por 24 horas. Posteriormente, uma pequena quantidade dessa suspensão foi adicionada ao caldo TSB até estar com uma concentração de acordo com a escala 1 de MacFarland (Probac do Brasil®). 200 µL dessa última suspensão foram adicionados em um poço de uma microplaca de poliestireno de 96 poços estéril (Kartell®). O ensaio de biofilme foi realizado em triplicata para todos os isolados e para o controle negativo, também em triplicata, foram preenchidos somente com 200 µL de caldo TSB sem glicose. As placas então foram cobertas com papel filme e incubadas por 24 horas a 37 °C. As suspensões bacterianas então foram lavadas por três vezes com solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% e secas ao ar. Após esse período cada poço foi adicionado 200 µL de metanol pelo período de 15 minutos para ocorrer a fixação das células bacterianas. Então as placas foram deixadas para secar em temperatura ambiente após a retirada do metanol. As células então foram coradas por 10 minutos com 200 µL de cristal violeta de Hucker a 1%, lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Por fim adicionou-se 200 µL de ácido acético (J. T. Baker®) a 33% e para realizar a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Biotek® ELx800) com comprimento de onda de 490 nm.

Para determinação da capacidade e intensidade de formação de biofilme dos isolados, utilizou-se quatro diferentes categorias de acordo com Stepanović et al. (2000). Isolados não formadores de biofilme (NF) quando a densidade óptica do isolado ( $DO_i$ ) for menor ou igual à  $DO_n$  ( $DO_i \leq DO_n$ ); fracamente formador de biofilme se  $DO_n < DO_i \leq 2xDO_n$ ; formador de biofilme moderado se  $2xDO_n < DO_i \leq 4xDO_n$  ou forte formador de biofilme se  $4xDO_n < DO_i$ .

## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli* EM ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS DE BOVINOS

Na pesquisa e identificação de *E. coli* nos frigoríficos de bovinos foi verificada a presença do microrganismo em 11 dos 34 *swabs* realizados no abatedouro frigorífico B1, o que corresponde a 32,4% (Tabela 01). Nos *swabs* realizados no abatedouro frigorífico B2 foi detectada a presença do microrganismo em 20%, 8 *swabs* de um total de 40, de acordo com a Tabela 02. Desta forma, conforme mostrado nas Tabelas 01 e 02, pode-se observar que do total dos 74 *swabs* coletados nos 2 estabelecimentos, a presença de *E. coli* foi detectada em 19, o que corresponde a 25,7% dos casos.

A distribuição da presença do microrganismo detectados nas instalações/ambientes dos dois abatedouros frigoríficos de bovinos encontram descritos na Tabela 01. Pode-se observar que foram encontrados esta presença em 38% dos *swabs* (8 de um total de 21) analisados nos ralos das salas de abate e 30,8% (4 em 13) nas paredes das salas de abate. Não foi detectado em nenhuma coleta a presença do microrganismo nas paredes das câmaras frias de resfriamento de carcaças. De todos os 40 *swabs* analisados oriundos de instalações/ ambientes das duas indústrias foram encontradas 12 estirpes de *E. coli*, perfazendo 30% do total (Tabela 01).

Tabela 01 Pesquisa e identificação de *Escherichia coli* a partir de *swabs* de arrastes nas instalações/ ambientes de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).

Região coletada	GO	DF	DF	
Identificação das indústrias	B1	B2	B2	
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	
Identificação dos locais coletados nas indústrias	<i>E. coli</i> / <i>swabs</i> realizados	<i>E. coli</i> / <i>swabs</i> realizados	<i>E. coli</i> / <i>swabs</i> realizados	Total de isolados de <i>E. coli</i> / <i>swabs</i> totais realizados
Paredes das câmaras frias de resfriamento de carcaças	0/2	0/2	0/2	0/6 (0%)
Paredes da sala de abate	2/5	2/4	0/4	4/13 (30,8%)
Ralos da sala de abate	5/9	2/6	1/6	8/21 (38%)
Total de isolados de <i>E. coli</i>	7	4	1	12 (30%)
Total de <i>swabs</i> analisados	16	12	12	40

Em relação à pesquisa de *E. coli* nos equipamentos e utensílios dos abatedouros B1 e B2, foi observada a presença de *E. coli* nos dois estabelecimentos. Foi detectada a presença em 37,5% dos swabs analisados (3 em 8) em ganchos de pendura da carcaça/ cabeça. Nas esteiras de miúdos foi observado esta presença apenas em 1 dos 7 swabs realizados (14,3%). A *E. coli* também foi encontrada em 42,9% (3 dos 7) swabs realizados em caixas brancas destinadas ao acondicionamento de produtos comestíveis. Não foi encontrada a presença da *E. coli* em tubulações de passagem de miúdos comestíveis, de mocotós, de materiais não comestíveis e em mesa de inspeção de vísceras. De todos os 34 swabs analisados, em equipamentos e utensílios, foram encontradas um total de 7 estirpes de *E. coli*, perfazendo 20,5% (Tabela 02) nos dois abatedouros B1 e B2.

Tabela 02 Pesquisa e identificação de *Escherichia coli* nos Equipamentos e Utensílios a partir de swabs de arrastes de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).

Região coletada	GO	DF	DF	
Identificação das indústrias	B1	B2	B2	
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Total de isolados
Identificação dos locais coletados	<i>E. coli</i> / swabs realizados	<i>E. coli</i> / swabs realizados	<i>E. coli</i> / swabs realizados	de <i>E. coli</i> / swabs totais realizados
Tubulações de aço inox (chutes) passagem de miúdos comestíveis	0/1	0/1	0/1	0/3 (0%)
Tubulações de aço inox (chutes) passagem de mocotós	0/1	0/1	0/1	0/3 (0%)
Tubulações de aço inox (chutes) de descarte de materiais não comestíveis	0/1	0/1	0/1	0/3 (0%)
Mesa de aço inox de inspeção de vísceras	0/1	0/1	0/1	0/3 (0%)
Ganchos de pendura de cabeça/carcaça	2/4	1/2	0/2	3/8 (37,5%)
Esteiras sala de abate	0/5	1/1	0/1	1/7 (14,3%)
Caixas plásticas de cores brancas	2/5	1/1	0/1	3/7 (42,9%)
Total de isolados de <i>E. coli</i>	4	3	0	7 (20,5%)
Total de swabs analisados	18	8	8	34

Os resultados de presença de *Escherichia coli* na parede da sala de abate detectados neste estudo coincidem com os resultados encontrados em Istambul na Turquia, por Çetin et al. (2006). Estes autores encontraram a presença de *E. coli* em diferentes paredes dentro de fábricas turcas de processamento de carnes vermelhas. Um outro estudo com resultados semelhantes aos encontrados neste presente estudo foi realizado no Paraná, por Barros et al. (2007). Eles verificaram a presença de

*E. coli* em amostras de *swabs* da parede da sala de abate, de um abatedouro frigorífico de bovinos localizado naquela região. Os resultados obtidos neste presente estudo também foram similares aos resultados de estudos prévios, em que Santos (2018) verificou a presença de *E. coli* em 16,13% dos *swabs* oriundos de parede da sala de abate de abatedouros frigoríficos no DF, Entorno e estado de Goiás, no ano de 2018.

A presença de *E. coli* detectada em 38% dos ralos da sala de abate deste estudo foram similares aos observados por Kabiru et al. (2015) ao detectarem *E. coli* em 80% de amostras de *swabs* de ralos de drenagem de um abatedouro frigorífico localizado na Região de Zaria, na Nigéria. No entanto, o percentual observado de 80% por aqueles autores foi superior em relação à percentagem de 38% observada neste estudo. Ainda em relação à detecção de *E. coli* em ralos, Barros et al. (2007) também encontraram a presença de *E. coli* em *swabs* realizados em ralos em um abatedouro frigorífico de bovinos no Paraná. A presença do microrganismo em ralos de abatedouros de bovinos verificada neste estudo confirmou a presença já previamente relatada pelo estudo de Santos em 2018, nesta mesma região. Fora do país, no entanto, divergindo do presente estudo, Rivera-Betancourt et al. (2004) não encontraram a presença de *E. coli* em nenhum ralo por eles analisados em abatedouros frigoríficos, localizados nas regiões norte e sul dos Estados Unidos.

Neste estudo não foram detectadas a presença de *E. coli* em paredes de câmaras frias das indústrias analisadas. Não existe outros trabalhos que tenham realizado o isolamento e identificação de *E. coli* em paredes de câmaras frias. No entanto, Stocco (2017), em um estudo similar, realizou uma pesquisa com amostras de *swabs* em maçanetas de câmaras frias de frigorífico de bovinos, localizado na região dos Campos Gerais – MG. A presença de *Escherichia coli* não foi detectada por este autor, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho.

Os resultados de detecção de *E. coli* em equipamentos e utensílios nos abatedouros frigoríficos de bovinos no presente estudo foram semelhantes, quanto à presença desta bactéria em ganchos de pendura de cabeça e carcaça, aos estudos realizados por Rivera-Betancourt et al. (2004). Estes autores encontraram a presença de *E. coli* em 2% dos ganchos em um abatedouro frigorífico, localizados na região norte dos Estados Unidos. No entanto a percentagem observada de 2% ficou inferior ao encontrado no presente estudo de 37,5 %. Stocco (2017) também pesquisou a presença de *E. coli* em ganchos e obteve a presença desta bactéria nestes utensílios em abatedouro frigorífico de bovinos, localizados na região de Campos Gerais, em Minas Gerais. Santos, (2018) também detectou *E. coli*, nas mesmas regiões deste estudo, em 16,13% dos ganchos de pendura de cabeças e carcaças de bovinos. Apesar do resultado positivo para *E. coli*, o estudo realizado por Santos (2018) detectou um valor abaixo do encontrado no presente estudo, em que a porcentagem obtida de *E. coli* foi 37,5%.



Neste estudo, a presença de *E. coli* foi detectada em 42,9% das caixas brancas analisadas, destinadas à armazenagem de produtos comestíveis. Corroborando com este resultado, Stocco (2017) detectou a presença de *E. coli* em amostras de *swabs* de caixas brancas, em abatedouros de bovinos na região de Campos Gerais, em Minas Gerais. No entanto, Tutenel et al. (2003) encontraram um resultado diferente do presente estudo na Bélgica em bandejas para vísceras comestíveis de bovinos, em que a presença de *Escherichia coli* não foi detectada.

No presente estudo não foi detectada a presença de *Escherichia coli* em nenhum tipo de tubulações de aço inox denominados de chutes (tubulações individualizadas de passagens de miúdos comestíveis, passagem de mocotós e descartes de materiais não comestíveis). Entretanto, um resultado diferente foi encontrado por Santos (2018), em estudos previamente realizados pelo nosso grupo de estudo, em que a autora obteve a presença de *E. coli* em 3,23% deste tipo de tubulações. Stocco (2017) também não detectou a presença de *E. coli* em mesas de aço inox de inspeção de vísceras em um frigorífico de produtos processados bovinos.

Há poucos trabalhos na literatura científica que relatam o isolamento de *E. coli* em ambientes de abatedouros frigoríficos de bovinos. No entanto, a pesquisa de *E. coli* em carcaças de bovinos no Brasil e no exterior é amplamente realizada e já foi observada em diferentes estudos como demonstrado por Abdissa et al. (2017), Atnafie et al. (2017), Manage et al. (2019), Loiko et al. (2016), Santos et al. (2018), Nespolo et al. (2014). Apesar de não trabalharem diretamente com a detecção da bactéria no ambiente, estes resultados podem ser utilizados como um parâmetro indireto na comparação com este estudo, em relação à presença deste microrganismo no interior deste tipo de indústria.

De uma maneira geral, foram poucos os resultados encontrados de presença de *E. coli* em paredes da sala de abate, ralos da sala de abate, ganchos de pendura de cabeça/carcaça, esteiras das salas de abates e caixas plásticas de cores brancas. Além disto, observou-se ausência em paredes das câmaras frias de resfriamento de carcaças, tubulações de aço inox (passagem de miúdos comestíveis, passagem de mocotós e descarte de materiais não comestíveis) e mesa de aço inox de inspeção de vísceras. Estes resultados podem ser justificados pelas poucas amostras coletadas em cada visita, e também por essas visitas terem sido previamente agendadas, o que poderia interferir na conduta da higienização e sanitização realizada pelos estabelecimentos, como o uso de produtos para desinfecção antes de se realizar a obtenção das amostras.

Por outro lado, uma outra justificativa poderia ser devido à crescente melhoria na higienização e sanitização, com a implementação dos programas de auto controle e boas práticas no ambiente das indústrias exigidos pelos órgãos de fiscalização como MAPA e Secretarias de Agricultura dos estados. Estas práticas vêm sendo implementado desde a década de 90 com o programa de Boas

práticas de fabricação (BPF) estabelecido pela Portaria n°. 1428 de 1993 do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 1993), e Portaria n° 368 aprovada pelo Ministério da Agricultura, agropecuária e abastecimento (MAPA) em 1997. Assim, pode-se concluir que todas essas normativas podem ter contribuído para a melhoria de produção higiênica nos estabelecimentos, que por sua vez refletiu nos poucos isolados de *E. coli* detectados neste estudo.

## 7.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli* EM ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS DE AVES

Na pesquisa e identificação de *E. coli* em abatedouros frigoríficas de aves, foi observada a presença do microrganismo em 5 dos 40 *swabs* realizados no abatedouro frigorífico A1 (12,5%), em 34 dos 50 (68%) *swabs* realizados no abatedouro frigorífico A2, e em 5 dos 31 (16,1%) *swabs* realizados no abatedouro frigorífico A3 (Tabelas 03 e 04). Totalizando desta forma 121 *swabs* coletados nos 3 estabelecimentos, nas quais foram detectados em 44 (36,4%) dos *swabs* analisados a presença de *Escherichia coli*.

Em relação à pesquisa nas instalações e ambientes dos estabelecimentos, o microrganismo foi detectado em 11 dos 24 *swabs* analisados em ralos (45,8%), sendo encontrada nos 3 estabelecimentos A1, A2 e A3. Nas coletas realizadas em paredes da área limpa da sala de abate foi observada a presença em apenas 1 (9%) dos 11 *swabs* analisados, detectando apenas a *E. coli* no estabelecimento A2. De todos os 35 *swabs* analisados, em instalações, foram encontradas 12 isolados de *E. coli*, perfazendo 30% (Tabela 03).

Tabela 03 Pesquisa e identificação de *Escherichia coli* a partir de *swabs* de arrastes nas instalações/ambientes de abatedouros frigoríficos de aves localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).

Região coletadas	DF	DF	GO	GO	DF	
Identificação das indústrias	A1	A1	A2	A2	A3	
Identificação dos locais coletados	Coleta 1 <i>E. coli</i> / <i>swabs</i> realizados	Coleta 2 <i>E. coli</i> / <i>swabs</i> realizados	Coleta 3 <i>E. coli</i> / <i>swabs</i> realizados	Coleta 4 <i>E. coli</i> / <i>swabs</i> Realizados	Coleta 5 <i>E. coli</i> / <i>swabs</i> realizados	Total de isolados de <i>E. coli</i> / <i>swabs</i> totais realizados
Ralos área limpa na sala de abate	1/3	0/3	4/5	4/5	2/8	11/24 (45,8%)
Paredes área limpa sala de abate	0/2	0/2	0/1	1/1	0/5	1/11 (9%)
Total de isolados de <i>E. coli</i>	1	0	4	5	2	12 (30%)

Total de swabs analisados	5	5	6	6	13	35
---------------------------	---	---	---	---	----	----

Nos equipamentos e utensílios foram detectados *E. coli* em chutes de passagem de cortes de carcaças de aves em 3 dos 6 *swabs* pesquisados, ou seja, 50%. Em relação a calha de embalagem de carcaças, a *E. coli* foi detectada em 42,9% 7 *swabs* analisados (3 de um total de 7 *swabs*). No chute direcionador de carne mecanicamente separada obteve-se o mesmo resultado anterior, encontrando a presença desta bactéria em 3 dos 7 *swabs* (42,9%). Para a esteira de cortes de carcaças de frangos, a presença da *E. coli* foi observada em 13 dos 18 *swabs* analisados (72,2%), estando a bactéria presente nos 3 estabelecimentos pesquisados. Em relação aos direcionadores de resíduos não comestíveis, este microrganismo foi encontrado apenas no estabelecimento A2, em 37,5% dos 8 *swabs* analisados (3 *swabs*). Não foi detectado o microrganismo em mesas de inspeção de miúdos, máquinas de evisceração e em máquinas de lavagem de fígados em nenhum dos frigoríficos analisados.

Do total dos 86 *swabs* analisados em todos os frigoríficos, em equipamentos e utensílios, foram encontradas 32 isolados de *E. coli*, perfazendo 37,2% dos casos analisados (Tabela 04).

Tabela 04 Pesquisa e identificação de *Escherichia coli* em equipamentos e utensílios a partir de *swabs* de arrastes de abatedouros frigoríficos de aves localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).

Região coletada	DF	DF	GO	GO	DF	
Identificação das indústrias	A1	A1	A2	A2	A3	
Identificação dos locais coletados	Coleta	Coleta	Coleta	Coleta	Coleta	Total de isolados de <i>E. coli</i> / <i>swabs</i> totais realizados
	1	2	3	4	5	
Chute -passagem dos cortes das carcaças de frango	0/1	0/1	1/1	1/1	1/2	3/6 (50%)
Chute - carne mecanicamente separada	0/1	0/1	2/2	1/2	0/1	3/7 (42,9%)
Chute - direcionadores de resíduos não comestíveis	0/1	0/1	2/2	1/2	0/1	3/7 (42,9%)
Calha De embalagem	0/1	0/1	2/2	1/2	0/1	3/7 (42,9%)
Mesas de inspeção de miúdos	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/6 (0%)
Mesas de aço inox de inspeção da carcaça	0/1	0/1	0/1	1/1	0/2	1/6 (16,7%)
Esteiras de cortes de frangos	0/2	1/2	5/6	5/6	2/2	13/18 (72,2%)
Direcionador de resíduos comestíveis	0/1	0/1	2/2	1/2	0/2	3/8 (37,5%)
Ganchos de pendura de carcaça	0/2	1/2	0/1	0/1	0/1	1/7 (14,3%)
Máquina de evisceração	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5 (0%)
Máquina lavagem moela	0/1	1/1	-	-	0/1	1/3 (33,3%)
Máquina lavagem fígado	0/1	0/1	-	-	0/1	0/3 (0%)
Máquina lavagem coração	0/1	1/1	-	-	0/1	1/3 (33,3%)
Total de isolados de <i>E. coli</i>	0	4	14	11	3	32 (37,2%)
Total de swabs analisados	15	15	19	19	18	86

São poucos os estudos no país que realizaram pesquisas do microrganismo em ambiente de abatedouro frigorífico de aves. A grande maioria destes estudos foram direcionados à pesquisa de *E. coli* em carcaça de frangos, como o estudo realizado por Rodrigues et al. (2008), que corroboram os resultados do presente estudo. Estes autores demonstraram a presença deste microrganismo em ambientes de frigoríficos de aves, mesmo não sendo detectado nas estruturas físicas das indústrias.

Neste estudo foram encontrados *E. coli* em 45,8% dos ralos das áreas limpas das salas de abate analisadas. Este resultado é semelhante ao encontrado por Santos, (2018), que obteve a *E. coli* em 25,9% dos ralos na região do Distrito Federal, Entorno e estado de Goiás. Não há mais trabalhos que tenham realizado o isolamento e identificação de *E. coli* em ralos de abatedouro frigoríficos de aves. Porém em um estudo similar, Keeratipibul et al. (2009) encontraram a presença de *E. coli* em 6,6% de *swabs* de chão em uma indústria de carne de frango na Tailândia.

Já em relação aos resultados de presença de *Escherichia coli* em paredes da área limpa na sala de abate, o presente estudo obteve presença em 9% dos *swabs* analisados. Corroborando este resultado, Jo & Woo (2016) obtiveram a presença de *E. coli* na região da Coreia do Sul, em paredes em um frigorífico de aves. Um outro estudo que encontrou um resultado semelhante foi realizado por Santos (2018) na região do Distrito Federal, Entorno e estado de Goiás em que a autora obteve a presença de *E. coli* em 3,44% das paredes.

Como detalhado anteriormente neste estudo, a *E. coli* esteve presente em 72,2% dos *swabs* analisados de esteiras de cortes de frangos. De maneira similar, Keeratipibul et al. (2010), encontraram a presença de *E. coli* em diferentes pontos de esteiras dentro de uma fábrica de carnes de frango cozidos congelados na região de Bangkok, Tailândia. Jo & Woo (2016) também obtiveram a presença desta bactéria em esteiras na linha de produção de frangos, na região da Coreia do Sul. No Brasil, na região de Palotina, Paraná, Viana (2014) também encontrou a presença desta bactéria, em uma esteira condutora de cortes de frango. Um outro estudo com resultado semelhante ao presente estudo foi o realizado por Casagrande (2016) em um frigorífico na região de Passos, em Minas Gerais, em que obteve a presença de *E. coli* em esteiras. Corroborando também com o presente estudo, Soares et al. (2018) obtiveram resultados que comprovaram a presença desta bactéria em esteiras na sala de corte de frigoríficos de aves localizadas na região sul do Brasil.

O resultado do presente estudo não demonstrou a presença da *E. coli* em mesas de inspeção de miúdos, máquinas de evisceração e máquinas de lavagem de fígado. Em relação a presença de *E. coli* em máquina de evisceração, Ho et al. (2004), encontraram um resultado distinto, já que eles observaram a presença de *E. coli* em máquina de evisceração em frigorífico na região de Taiwan. Um outro resultado encontrado diferente do presente estudo, foi realizado na Província de Ismailia no

Egito, em que Ezzat et al. (2018) encontraram a presença de *E. coli* em *swabs* realizados de superfície de equipamentos que estavam em contato direto com fígados de aves.

No presente estudo foram observados a presença de *E. coli* em amostras de *swabs* de superfícies de ambientes e utensílios em abatedouros frigoríficos de aves. A ausência de trabalhos, similares ao presente estudo, não permite dizer se esses valores encontram se altos ou baixos. Porém pode-se observar que as medidas de boas práticas e procedimentos de APPCC estão sendo continuamente implementados visando uma melhoria das condições de higiene nas indústrias produtoras de carnes. Essas medidas, que visam a redução de microrganismos presentes dentro da indústria, começaram a serem estabelecidos no Brasil na década de 90. Nesta época foi implementado o Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos (BRASIL, 1997), e o Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves (BRASIL, 1998). Em seguida, em 2006, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece o plano básico de APPCC para indústrias de produtos de origem animal visando a eliminação de microrganismos em carnes de aves (BRASIL, 2006). A manutenção da higiene do abate e o monitoramento regular dos estabelecimentos de carne são essenciais para minimizar o risco de contaminação direta e cruzada da carne, garantindo assim a qualidade do produto final e a proteção da saúde pública (Keeratipibul et al. 2010).

Portanto, os resultados obtidos neste estudo indicam a presença destes microrganismos no ambiente de abatedouro frigorífico de aves. Esse resultado demonstra a importância da contínua implementação em conjunto das Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) pelas indústrias, evitando ou minimizando assim presença do microrganismo.

### 7.3 IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

No presente estudo foram pesquisados doze (12) genes codificadores de fatores de virulência descritos em *E. coli*, em um total de 63 isolados de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves (Tabela 05).

Tabela 05 Detecção de genes de marcadores de virulência em isolados de *Escherichia coli* oriundos de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves, localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).

Marcadores de virulência de <i>Escherichia coli</i>	Isolados oriundos de Abatedouro frigorífico de bovinos		Isolados oriundos de Abatedouro frigorífico de aves			TOTAL de gene de virulência/ Total de isolados
	Identificação das indústrias					
	GO	DF	DF	GO	DF	
	Nº de isolados com gene de virulência/ total de isoladas por abatedouro frigorífico (%)					
	B1/11	B2/8	A1/5	A2/34	A3/5	
<i>Eae</i>	0	1 (1,6)	0	2 (3,2)	0	3/63 (4,8%)
<i>Stx 1</i>	3(4,8)	3(4,8)	0	8(12,7)	1 (1,6)	15/63 (23,8%)
<i>Stx 2</i>	0	0	0	0	0	0/63(0%)
<i>Stx 2c</i>	0	0	0	0	0	0/63(0%)
<i>Stx 2d</i>	0	0	0	0	0	0/63(0%)
<i>Stx 2e</i>	0	0	0	0	0	0/63(0%)
<i>Stx 2f</i>	0	0	0	0	0	0/63(0%)
<i>Tir α</i>	0	0	0	0	0	0/63(0%)
<i>Tir β</i>	0	1(1,6)	0	1(1,6)	0	2/63(3,2%)
<i>Tir γ</i>	0	0	0	0	0	0/63(0%)
<i>HlyA</i>	1 (1,6)	1(1,6)	0	4(6,3)	0	6/63(9,5%)
<i>Saa</i>	0	0	0	3(4,8)	0	2/63 (3,2%)
Total de genes de virulência presentes/ total de isolados	4/11	6/8	0/5	17/34	1/5	33/63

Na Tabela 06 encontram-se descritos o local em que os isolados de *E. coli*, com seus respectivos genes de virulência, foram detectados nos abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves, localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).

Tabela 06 Locais de isolamento de *E. coli* com genes de virulência em plantas de processamento de abatedouros Frigoríficos de bovinos e aves localizados no estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).

Genes marcadores de virulência	Abatedouro frigorifico de bovinos		Abatedouro frigorifico de aves	
	Quantidade de isolados	Identificações dos locais na planta de processamento	Quantidade de isolados	Identificações dos locais na planta de processamento
<i>Eae</i>	1	Ralo da área limpa da sala de abate	1	Esteira de cortes de frango
			1	Direcionadores de resíduos comestíveis
<i>Stx 1</i>	2	Caixas plásticas brancas	1	Mesa de aço inox inspeção carcaça
	2	Ralos da área limpa na sala de abate	2	Ralos área limpa da sala de abate
	2	Paredes área limpa sala de abate		
			4	Esteiras de cortes de frangos
			1	Direcionador de resíduos comestíveis
			1	Calha embalagem
<i>Tir β</i>	1	Ralo área limpa na sala de abate	1	Esteira de cortes de frango
<i>hlyA</i>	1	Ralo da área limpa da sala de abate	1	Ralo área limpa na sala de abate
	1	Caixas plásticas brancas	1	Maquina lavagem coração
			1	Esteira de corte de frango
			1	Calha embalagem
<i>Saa</i>	0		1	Chute Direcionador de resíduos não comestíveis
			1	Chute - CMS

No presente estudo, o gene da Shiga like toxina do Tipo 1 (*Stx 1*) foi o mais detectado em *E. coli* isolados nos abatedouros frigoríficos de bovinos (9,6%), das quais foram detectados em Caixas plásticas brancas, ralos da área limpa na sala de abate e paredes área limpa sala de abate (Tabela 06), e no abatedouro frigorífico de aves (14,3%) mesa de aço inox inspeção carcaça, ralos área limpa da sala de abate, esteiras de cortes de frangos, direcionador de resíduos comestíveis e calha embalagem (Tabela 06), correspondendo a 15/63 (23,9%) dos isolados totais. Corroborando com este resultado no que se refere à detecção deste gene em produtos de origem animal e ou relacionados, Sethulekshmi et al. (2018) avaliaram a presença do gene *Stx 1* em carne bovina na Região de Querala, Índia e encontraram em 83,6% amostras analisadas. Etcheverría et al. (2010) detectaram *Stx I* em 9,52% de

*E coli* isoladas de abatedouros, em 7,69% de *E coli* isoladas de carcaças e em 9,52% de *E coli* isoladas de cortes cárneos. No Brasil, ainda corroborando com o presente estudo em relação a presença desse gene em cepas de *E. coli* em bovinos, Rigobelo et al. (2008), no estado de São Paulo, encontraram o gene *Stx 1* em 1,4% das carcaças de bovino em um abatedouro frigorífico. Ainda no estado de São Paulo, Von Laer (2008), detectaram a presença de *Stx 1* em isolados de *E coli* oriundo de carcaças de bovinos criados em regime de confinamento.

Em relação a detecção do gene *Stx 1* em isolados oriundos de carcaças ou produtos relacionados de aves, Alonso et al. (2012) também encontraram a presença deste gene, em isolados de *E. coli* oriundos de carcaças de frangos abatidos na Argentina, em 3,3%. Na Índia, Rasheed et al. (2014) encontraram a presença de *Stx 1* em 36% das *E. coli* isoladas de carne frango. Ao contrário dos resultados mostrados acima e daqueles obtidos neste estudo, Bagheri et al. (2014) não encontraram a presença do gene *Stx 1* em nenhuma carcaça de frango da província de Kerman, no Irã. No Brasil, Silva et al. (2011) encontraram a presença do gene *Stx 1* em 13,3% dos isolados de *E. coli* oriundos de fígado de frangos, provenientes de abatedouros avícolas da região de Recife, Pernambuco. Silva et al. (2011) identificaram o gene *Stx* em 13,3% dos isolados de *E. coli* de fígado de frango provenientes de dois abatedouros frigoríficos avícolas no Recôncavo da Bahia.

A *E. coli* produtora de pelo menos umas das toxinas de Shiga (*Stx 1* ou *Stx 2*) é denominada de produtora de toxina Shiga like toxina (STEC). A pesquisa desse gene em *E. coli* é importante devido ao fato dele ser o principal fator de virulência deste microrganismo que o classifica como STEC (produtora de toxina Shiga). O gene atua diretamente na patogênese de diferentes doenças em humano como diarreias e a síndrome urêmica-hemolítica (KAPER, 2005; GYLES, 2007; ALTERTHUM & TRABULSI, 2015). O resultado do presente estudo demonstra a presença desse gene em ambientes utensílios de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves no estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF). Outros estudos já haviam relatado a presença deste gene na região de Goiás, em alimentos de origem animal como o leite (FERREIRA et al., 2018), em caprinos e ovinos (GUIMARÃES et al., 2015; FERREIRA et al., 2015), em bovinos saudáveis (MORAIS et al., 2011) em carne bovina e queijos frescos (NASCIMENTO et al., 2013). No Distrito Federal, a presença do gene foi verificada em suínos hígidos (DRUMMOND & PERECMANIS, 2013) e fezes de cães saudáveis (VIEIRA et al., 2020). Estes fatos comprovam a circulação de estirpes na região, o que está em acordo com os resultados obtidos neste estudo.

Não há relatos de detecção do gene *Stx 1* em ambiente e utensílios de abatedouros frigoríficos de aves e bovinos no Distrito Federal e Goiás, sendo este o primeiro trabalho realizado neste tipo de ambiente. Assim, o presente estudo contribui de maneira inédita com os dados de pesquisa da região. Este trabalho tem relevância devido a importância desse gene, uma vez que a presença do mesmo em



ambiente e utensílios em abatedouro frigorífico de bovinos e aves pode representar um risco para a saúde pública.

O segundo gene de virulência mais frequente nos isolados de *E. coli* deste estudo foi o *hlyA*, sendo encontrados em 9,5% dos casos, conforme mostrado na Tabela 05. Destes, 3,2% dos casos foram obtidos nas amostras dos ralos da área limpa da sala de abate e caixas plásticas brancas nos abatedouros frigoríficos de bovinos (Tabela 06). Os 6,3% restantes foram observados nas amostras obtidas em Ralo área limpa na sala de abate, máquina lavagem coração, esteira de corte de frango e calha embalagem, de acordo com a Tabela 06.

Similar ao presente estudo no que se refere à detecção deste gene de virulência em alimentos de origem animal, Martínez-Vázquez et al. (2018) em Tamaulipas, no México encontraram 21,5% isolados de *E. coli* carregando o gene *hlyA*, em amostras de varejo de carnes bovina e suína em diferentes locais. Toro et al. (2018) também encontraram resultados similares, ao observarem a presença deste gene em 37,5% das amostras de amostras de carne bovina na cidade de Santiago, Chile. Corroborando também com o presente estudo, Xia et al. (2010) encontraram em 41% isolados de *Escherichia coli* positivas para o gene *HlyA*, oriundas de carne moída bovina nos Estados Unidos. No Brasil, em um município da região Noroeste do Rio Grande do Sul, Damer (2016), encontrou uma porcentagem semelhante ao do presente estudo. Este autor analisou a presença desse gene em carne moída bovina in natura e obteve um valor de 11,5% isolados de *E. coli* carregando o gene *HlyA*. na região sul do Brasil. De maneira opostas aos resultados anteriores e também de maneira distinta ao presente trabalho, Timm et al. (2009) e Fernandes et al. (2017) não encontraram tal gene em isolados oriundos de carne moída bovina e na linha de produção de carne seca, respectivamente.

O gene *HlyA* codifica a  $\alpha$ -hemolisina, uma toxina que leva à lise dos eritrócitos, auxiliando a ingestão de ferro pela bactéria que tem por *habitat* o intestino (DONTOROU et al., 2003). O gene contribui para a patogênese, agindo como uma citolisina formadora de poros em eucarióticos (XIA et al., 2010). Ainda de acordo com estes mesmos autores, a presença deste gene pode aumentar a virulência do microrganismo. Não há nenhum estudo anterior que descreva a presença deste gene em ambiente e utensílios de abatedouros frigoríficos de aves e bovinos no estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF). Assim, este também é o primeiro trabalho realizado sobre este assunto, contribuindo desta forma com dados de pesquisa na região. Como mostrado, os resultados obtidos demonstram um potencial risco para saúde pública.

Outro gene detectado no presente estudo foi o gene *Eae* (Figura 01). Este gene totalizou 4,8% do total de isolados de *E. coli*, conforme a Tabela 05. O mesmo foi detectado em 1,6% dos isolados de abatedouros frigoríficos de bovinos e estavam localizados em ralo da área limpa da sala de abate (Tabela 06). Nos frigoríficos de aves este gene estava presente em 3,2% dos casos conforme a Tabela

05. Estes genes estavam localizados em esteira de cortes de frango e direcionadores de resíduos comestíveis (Tabela 06). Corroborando com este resultado, Minh et al. (2015), encontraram a presença deste gene em *E. coli* isoladas de carnes bovinas na cidade de Fukuoka, Japão. Monaghan et al. (2012) também encontraram o gene *Eae* em 0,7% de isolados obtidos de carcaça bovina na Irlanda. Alonso et al. (2012) demonstraram contaminação de 20% por cepas contendo o gene *Eae*, em produtos de frangos comercializados na Argentina. No Brasil, Oliveira et al. (2008) encontraram o gene em 0,6% de *E. coli* isoladas de bovinos na região de Minas Gerais. Diferentemente do presente estudo, Toro et al. (2018) não encontraram a presença do gene *Eae* em cepas de *E. coli* em amostras de carne bovina na cidade de Santiago, Chile. De maneira similar, Xia et al. (2010) também não verificaram a presença deste gene em carne moída bovina nos Estados Unidos. Em relação a detecção do gene *Eae* em isolados de carnes de aves e ou produtos relacionados, Sekhar et al. (2017) encontraram a presença deste gene em 10% das *E. coli* oriundos de carnes de frangos na Índia. No Brasil, Cerutti et al. (2020) encontraram o gene da proteína intimina (*Eae*) em em 4,8% das *E. coli* isoladas de carcaças de frangos no estado de Santa Catarina.

As cepas de *E. coli* EHEC e EPEC produzem uma lesão histopatológica característica nas microvilosidades de enterócitos, conhecida como uma lesão de “*attaching-and-effacing*” (A/E). A formação dessas lesões é mediada por uma ilha de patogenicidade denominada *locus* de Apagamento de Enterócitos (LEE) que contém o gene *Eae*. Devido à patogenia causada por esse gene, justifica-se a importância da detecção em cepas de *E. coli*. Mais uma vez este estudo o primeiro a demonstrar a presença do gene *Eae* em cepas de *E. coli* isolados de utensílios e ambiente de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves nas regiões do Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).

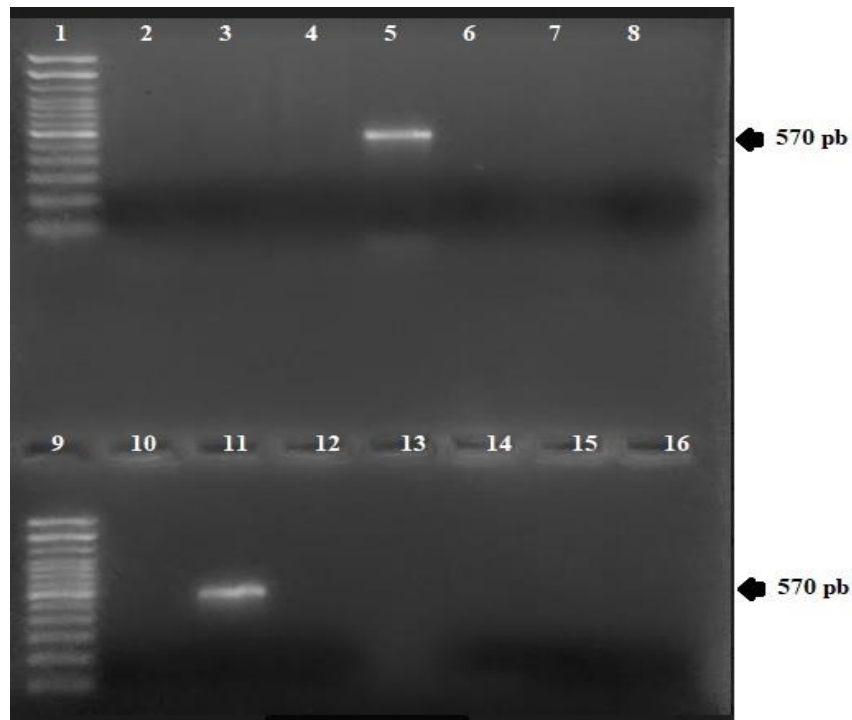
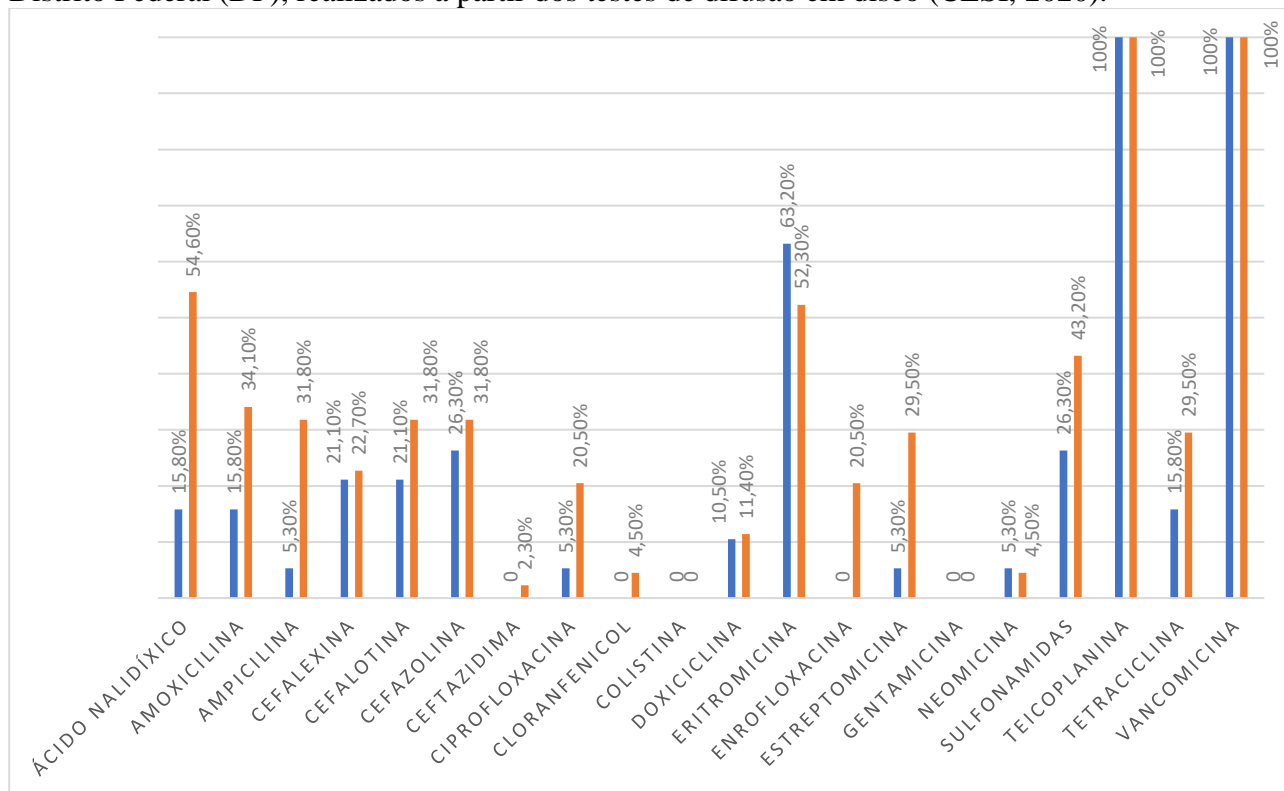


Figura 01 Resultado da pesquisa por PCR do gene *Eae* nos isolados de *E. coli*. Números 1 e 9: marcador DNA Ladder 100 bp (Invitrogen®); Número 5: isolado B2 oriundo do ralo da sala de abate do abatedouro de bovinos do DF; Número 11: isolado A56 oriundo da esteira de cortes de carcaça de frango no abatedouro frigorífico localizado no Estado do Goiás. Ambos amplificaram o gene *Eae* (570pb); Números: 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15 e 16 isolados com a PCR negativos para detecção do gene *Eae*. Visualização em gel de agarose 2% em transiluminador (Major Science®).

#### 7.4 RESULTADO DO ANTIBIOGRAMA DOS ISOLADOS DE *Escherichia coli* ORIUNDOS DE ABATEDOUROS FRIGORIFICOS DE BOVINOS E DE AVES LOCALIZADOS NO ESTADO DE GOIÁS (GO) E DISTRITO FEDERAL (DF).

Os resultados do antibiograma realizado nos 63 isolados de *E. coli* oriundos de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves estão descritos na Gráfico 01. Foram realizados em 19 isolados em frigoríficos de bovinos e em 44 de aves.

Gráfico 01 Perfil de resistência antimicrobiana em 63 isolados de *E. coli*, oriundos de ambiente e utensílios de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF), realizados a partir dos testes de difusão em disco (CLSI, 2020).



Azul: isolados de *E. coli* oriundas de abatedouro frigorífico de bovino; laranja: isolados de *E. coli* oriundo de abatedouro frigorífico de aves.

Os antimicrobianos com maior percentual de resistência observados foram a Teicoplanina e Vancomicina com 100% de resistência, tanto em amostras oriundas de abatedouro frigorífico de bovinos quanto para os de aves. Esse resultado já era esperado devido ao fato desses dois antimicrobianos apresentarem grandes moléculas polares, e em consequência não conseguem penetrar na membrana lipídica das bactérias Gram-negativas, sendo assim inativas contra esses organismos (WOOD, 1996). Tanih et al. (2015) encontraram também uma resistência de 100% para a Vancomicina em isolados de *E. coli* presentes em carcaças de bovinos e suínos abatidos em um matadouro no distrito de Vhembe, na África do Sul. Ao contrário dos resultados do presente estudo, Kaushik et al. (2018) encontraram uma porcentagem de resistência de 74.1% na Índia, em *E. coli*

isoladas de carne de frango e ovos para a Vancomicina, o que justificou desta forma a pesquisa de resistência à essas drogas neste estudo, apesar dessa característica de resistência intrínseca.

Em seguida, o antimicrobiano que apresentou maior resistência antimicrobiana em isolados de *E. coli* de abatedouro frigorífico de bovino foi a Eritromicina, com 63,2%. Corroborando com este resultado, Tanih et al. (2015) encontraram 92,3% de *E. coli* resistentes a esse antimicrobiano isolados de carcaças de bovinos e suínos na África do Sul. Stella et al. (2013) também encontraram um perfil de resistência maior desse antimicrobiano em isolados de *E. coli* oriundos de bovinos, com 97,7% de resistência, no Estado de Goiás.

Entre as escolhas terapêuticas para o tratamento da *E. coli* indicam-se os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e as fluoroquinolonas (BERGOGNE-BÉRÉZIN, 2006). Neste estudo a resistência a essas classes de antimicrobianos foram 26,3% para Cefazolina 21,1% para Cefalexina e Cefalotina, 15,8% para Amoxicilina, 5,3% para Ampicilina e Ciprofloxacina. Foi observado ainda a ausência de resistência para Enrofloxacin e Ceftazidima. Pádua, (2018) encontrou uma porcentagem de resistência a Ciprofloxacina de 2% dos isolados de *E. coli* oriundos de carcaças de bovinos, obtidas em frigorífico no município de Mineiros, Goiás. Estes resultados são semelhantes aos obtidos no presente estudo. Porém a mesma autora relata um valor superior de resistência a Cefalotina, na qual detectou 82% das amostras de *E. coli*. Van et al. (2008) encontraram valores semelhantes aos obtidos neste estudo. Estes autores não detectaram resistência para Ciprofloxacina e Enrofloxacin em isolados de *E. coli* de carne bovina no Vietnã. De maneira distinta aos resultados obtidos neste trabalho, Chika et al. (2016) em *E. coli* oriundas de bovinos na Nigéria, encontraram uma porcentagem elevada em relação ao antimicrobiano Ceftazidima com 83,9% dos isolados de *E. coli* resistentes.

Não foi detectado a presença de resistência a Gentamicina nos isolados de *E. coli* no presente estudo, o que neste caso é um bom indicativo devido ao fato deste antimicrobiano ser indicado para o tratamento de infecções graves em humanos (LUJÁN et al. 2012). Van et al. (2008) também não encontrara resistência para esse antimicrobianos em seus estudos em isolados de *E. coli* oriundos de carne bovina no Vietnã, indo, portanto, ao encontro dos resultados mostrados neste trabalho.

Um outro antimicrobiano que não se detectou a presença de resistência no presente estudo foi o Cloranfenicol. Isso pode ser explicado devido ao fato deste antimicrobiano ter seu uso proibido na produção animal do Brasil desde 2003 (BRASIL, 2003b).

Em isolados de *E. coli* oriundos de abatedouros frigoríficos de aves, os antimicrobianos que apresentaram um maior percentual de resistência foram o Ácido nalidíxico, com 54,6%, seguido da Eritromicina com 52,3% e a Sulfonamidas com 43,2% de isolados resistentes (Tabela. 07). Estes resultados são similares aos obtidos por Abreu et al. (2010) em isolados de *E. coli*, oriundas de carcaças de codornas. Eles encontraram uma resistência ao Ácido nalidíxico de 60% no Rio de

Janeiro. Já Gonçalves & Andreatti (2010) encontraram resistências maiores para Sulfonamidas com 59,2%, e menores para o Ácido nalidíxico, que apresentou 37% de resistência em isoladas de *E. coli* isoladas de aves em Botucatu, São Paulo. Korb et al. (2015) encontraram 62% de resistência ao antimicrobiano Ácido nalidíxico em amostras de *E. coli* de fezes de frangos de corte criados em sistema intensivo em Curitiba. Van et al. (2008), em carne de frango no Vietnã, encontraram valores de resistência ao Ácido nalidíxico e sulfonamidas de 68.4% e 94.7%, respectivamente.

Em relação ao antimicrobiano Eritromicina foi observado uma resistência de 52,3%, apesar do seu uso na produção de aves e suínos ter sido proibido no Brasil pela Instrução normativa nº 14, publicada no ano de 2012. Este fato indica a circulação desta resistência neste microrganismo nas regiões deste estudo.

Neste estudo foram observadas resistências a Amoxicilina de 34,1%, em Ampicilina de 31,8%, Tetraciclina com 29,5%, Ciprofloxacina com 20,5% e a Doxiciclina com 11,4%. Bezerra et al. (2016) também encontraram resistência em isolados de *E. coli* oriundos de frango de corte em Fortaleza, na qual a tetraciclina apresentou resistência de 95,4%, Ciprofloxacina de 91,4% e Ampicilina 87,3%. Korb et al. (2015) encontraram em amostras de *E. coli* de fezes de frangos de corte criados em sistema intensivo em Curitiba com uma resistência a Ampicilina de 100%, Tetraciclina de 83% e Ciprofloxacina de 23%. Cardoso et al. (2015) detectaram em *E. coli*, isoladas de aves comerciais na cidade de São Paulo, com uma porcentagem de resistência para Amoxicilina de 96,7%, Tetraciclina com 71,7% e Doxiciclina com 66,7%. É importante ressaltar que estas drogas (tetraciclina, beta lactâmicos, quinolonas e sulfonamidas sistêmicas) foram proibidas para uso como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais em 2009 pela Instrução Normativa nº 26 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). No entanto esses resultados demonstram que ainda se verifica a presença de resistência a esses antimicrobianos e que essa resistência ainda continua circulando nos isolados de *E. coli* na região deste estudo e no Brasil.

Os resultados obtidos neste estudo são de importância para a saúde pública, demonstrando que o ambiente em que se é produzido os produtos de origem animal podem estar contaminados com *E. coli* resistentes a antimicrobianos, e que podem contaminar o produto final, tornando-se assim uma possível ameaça à saúde pública.

7.5 RESULTADO DA PESQUISA DE GENE DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DE *Escherichia coli* ORIUNDOS DE ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS DE BOVINOS E DE AVES LOCALIZADOS NO ESTADO DE GOIÁS (GO) E DISTRITO FEDERAL (DF).

Os resultados da pesquisa de genes de resistência aos antimicrobianos realizada nos 63 isolados de *E. coli* isolados de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves estão descritos na Tabela 07.

Tabela 07 Resultado da presença de genes de resistência aos antimicrobianos em 63 isolados de *E. coli*, isoladas de ambiente e utensílios de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF)

classe de antibiótico	Gene	Número de isolados de <i>E. coli</i> com gene de resistência antimicrobiana em isolados de abatedouros frigoríficos de bovinos (%)	Número de isolados de <i>E. coli</i> com gene de resistência antimicrobiana em isolados de abatedouros frigoríficos de aves (%)
Beta -lactâmicos	<i>BlaSHV</i>	0/19 (0)	0/44 (0)
	<i>AmpC</i>	12/19 (63,2%)	31/44 (70,5%)
Tetraciclina	<i>Tet(A)</i>	1/19 (5,3%)	13/44 (29,5%)
	<i>Tet(B)</i>	10/19 (52,6%)	15/44 (34,1%)
	<i>Tet(C)</i>	0/19 (0)	0/44 (0)
	<i>Tet(M)</i>	0/19 (0)	0/44 (0)
Sulfonamidas	<i>Sul I</i>	3/19 (15,8%)	11/44 (25%)
Cloranfenicol	<i>Cat 1</i>	0/19 (0)	0/44 (0)
	<i>Cmla</i>	1/19 (5,3%)	8/44 (18,2%)
Aminoglicosídeo	<i>Aac(3)-I</i>	1/19 (5,3%)	4/44 (9,1%)
Polimixinas	<i>Mcr- 1</i>	0/19 (0)	0/44 (0)
	<i>Mcr- 2</i>	0/19 (0)	0/44 (0)
	<i>Mcr- 3</i>	0/19 (0)	0/44 (0)
	<i>Mcr- 4</i>	0/19 (0)	0/44 (0)

Nos isolados dos abatedouros frigoríficos de bovinos foram encontrados os genes de resistência *AmpC* de 63,2% para beta lactâmicos, *Tet(B)* com 52,6% para tetraciclinas, *Sul 1* com 15, 8% para sulfonamidas e *Aac(3)-I* para aminoglicosídeos e *Cmla* para cloranfenicol, ambas com 5,3%. De maneira similar, Karczmarczyk et al. (2011) encontraram em isolados de *E. coli*, oriundos de bovinos vivos na Irlanda, os genes de resistência *Tet(A)* em 67% dos casos, *Tet(B)* em 31% e *Sul1* com 26%. Ao contrário, Karczmarczyk et al. (2011) não encontraram a presença do gene *Cmla*. Galarce et al. (2020) em isolados de *E. Coli* oriundos de conteúdo intestinal de bovinos e suínos de abatedouros no Chile também encontraram os seguintes genes de resistência, *Tet(A)* com 100%, *Tet(B)* com 94.4%, *AmpC* com 81.5%. Corroborando também com o presente estudo em relação à presença de alguns genes de resistência antimicrobiana em *E. coli*, Furlan et al. (2019), em isolados deste microorganismo oriundos de amostras fecais obtidas em uma fazenda em São Paulo, obtiveram

presença para os seguintes genes de resistência: *Tet(A)* com 78,6%, *Sul1* com 42,9% e *Cmla* com 14,3%. Diferente do presente estudo, na qual não foi detectada a presença do gene de resistência para o Cloranfenicol (*Cat 1*), *BlaSHV* e *Tet(C)*, Galarce et al. (2020) encontraram a presença do gene *Cat 1* em 61.1% dos isolados de *E. coli*. Além disso, Furlan et al. (2019) detectaram a presença para os genes *BlaSHV* com 21,4% e *Tet(C)* com 7,1%.

Os resultados detectados para os isolados de abatedouros frigoríficos de aves foram a presença de uma resistência para *AmpC* de 70,5%, *Tet(B)* com 34,1%, *Tet(A)* com 29,5%, *Sul 1* com 25% e *Cmla* com 18,2%. Semelhante ao presente estudo, Ibrahim et al. (2019) encontraram em isolados de *E. coli* oriundos de frangos de corte na Jordânia, uma prevalência de genes de resistência antimicrobiana para os genes *Tet (A)* com 78.4% e *Sul 1* de 72.4% e para o gene *Tet (B)* em 30.5%. Kim et al. (2020) em isolados de *E. coli* em Frangos na Coreia do Sul, também encontraram a presença dos genes de resistência para *Tet (A)* com 46.8%, *Tet (B)* com 12.7%, *Sul 1* e *Cmla* ambos com 6.3%. Yonn et al. (2020) encontraram genes de resistência em isolados de *E. coli* para os genes *Tet (A)* com 56,3%, *Tet (B)* com 12,5% e *Sul 1* com 6,25%. No presente estudo não foram encontrados os genes de resistência, *BlaSHV*, *Tet (C)*, *tet (M)* e *Cat 1*. Yoon et al. (2020) também não encontraram o gene *Tet (C)* em isolados de *E. coli* de aves na Coreia do Sul. Ibrahim et al. (2019) encontraram um resultado diferente do presente estudo, na qual os autores detectaram a presença do gene *Cat 1* em 61.7% e *BlaSHV* em 1.8% e isolados de *E. coli*. Kim et al. (2020) também encontraram resultados distintos para os genes *Cat 1* com 6,3% e *Tet C* com 2.5%. Yoon et al. (2020) também encontraram um resultado diferente, na qual os autores encontraram o gene *Cat 1* em 6,25%, em isolados de *E. coli* oriundas de aves na Coreia do sul.

De uma maneira geral os resultados de detecção dos genes de resistência antimicrobiana contribuem com informações para a região em relação à circulação destes genes nesta bactéria.



7.6 ANÁLISES DOS ISOLADOS DE *Escherichia coli* PARA DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA, GENES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANAS E ANTIBIOGRAMA OBTIDOS DE ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS DE BOVINOS E DE AVES LOCALIZADOS NO ESTADO DE GOIÁS (GO) E DISTRITO FEDERAL (DF).

Nas Tabelas 08 e 09 encontram-se os resultados individuais, por isolado, de detecção dos marcadores gênicos de virulência, dos genes de resistência antimicrobiana e do antibiograma, obtidos dos abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves das regiões do Distrito Federal e Goiás.

Tabela 08 Resultados individuais, por isolado, de detecção dos marcadores gênicos de virulência, dos genes de resistência antimicrobiana e do antibiograma, obtidos dos abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).

Isolados de <i>E. coli</i> com suas respectivas identificações	Região da localização da indústria	Local de obtenção do isolado dentro da indústria	Gene de resistência antimicrobiana	Drogas Resistentes no Antibiograma	Multirresistente <sup>1</sup>	Genes de virulência
B2	DF	Ralo sala de abates	<i>Sul 1, Tet (B), AmpC</i>	NAL, DOX, EST, SUL, TEC, TET, VAN	X	<i>Eae, Tir Beta</i>
B7	DF	Parede sala de abate	<i>AmpC</i>	CFE, CFL, CFZ, TEC, VAN		0
B8	DF	Caixa plástica branca	<i>Sul 1</i>	ERI, SUL, TEC, VAN	X	<i>Stx 1</i>
B13	DF	Gancho de pendura de cabeça/carcaça	<i>AmpC</i>	ERI, VAN, TEC		0
B14	DF	Parede sala de abate	<i>AmpC</i>	ERI, TEC, VAN		<i>Stx 1</i>
B16	DF	Ralo sala de abates	<i>Tet (B)</i>	TEC, VAN		<i>Stx 1</i>
B20	DF	Esteira sala de abate	<i>Tet (B)</i>	ERI, TEC, VAN		0
B23	GO	Gancho de pendura de cabeça/carcaça	<i>AmpC, Tet (B),</i>	NAL, AMO, AMP, CFE, CFL, CFZ, CIP, DOX, ERI, NEO, SUL, TEC, TET, VAN	X	0
B25	GO	Ralo sala de abate	0	ERI, VAN, TEC		0
B26	GO	Ralo sala de abate	<i>Cmla, AmpC, Tet (B)</i>	ERI, TEC, VAN		0
B29	GO	Ralo sala de abate	<i>AmpC, aaa(3)-I</i>	CFZ, ERI, SUL, TEC, VAN	X	0
B33	GO	Gancho de pendura de cabeça/carcaça	0	TEC, VAN		0
B34	GO	Ralo sala de abate	<i>Tet(B), AmpC</i>	CFE, CFL, CFZ, ERI, TEC, VAN	X	0
B35	GO	Parede sala de abate	<i>AmpC</i>	TEC, VAN		<i>Stx 1</i>

B41	GO	Ralo sala de abate	<i>Tet (A), Tet (B)</i>	AMO, CFE, VAN, CFL, CFZ, ERI, TEC	X	<i>Stx 1</i>
B43	GO	Caixa plástica branca	<i>Sul I, Tet (B), AmpC</i>	NAL, SUL, TEC, TET, VAN	X	<i>Hly<sub>a</sub></i>
B44	GO	Caixa plástica branca	<i>Tet (B)</i>	TEC, AMO, VAN		<i>Stx 1</i>
B50	GO	Paredes sala de abate	<i>AmpC, Tet (B)</i>	ERI, TEC, VAN		0
B60	DF	Ralo sala de abate	<i>AmpC</i>	ERI, TEC, VAN		<i>Hly<sub>a</sub></i>
Total de isolados		19				

Na análise conjunta dos resultados dos isolados obtidos dos abatedouros frigoríficos de bovinos, o isolado B2 apresentou os genes de resistência antimicrobiana *Sul I* e *Tet (B)*. Esses genes são expressos e conferindo o fenótipo de resistência para Tetraciclina (TET) e Sulfonamidas (SUL). Este isolado ainda apresentou resistência ao Ácido Nalidíxico (NAL), Doxiciclina (DOX), Estreptomicina (EST), Teicoplanina (TEC) e Vancomicina (VAN). A amostra B2 foi obtida do ralo da sala de abate da indústria de bovinos, localizado na região do Distrito Federal, podendo ser uma fonte de disseminação importante na indústria. Este isolado apresenta potencial patogênico devido ao fato dele apresentar os genes de virulência *Eae* e *Tir β*, que são genes responsáveis pela colonização da mucosa intestinal de animais e humanos, e por desencadarem uma lesão característica conhecida como lesão “*attaching and effacing*” (A/E) (FRANKEL et al., 1998). Esse tipo de lesão subverte a função das células epiteliais intestinais (FRANKEL et al., 1998).

Outros isolados importantes observados no presente estudo foram os que apresentaram o gene *Stx 1* (B8, B14, B16, B35, B41 e B44). Esses isolados são denominados de *E. coli* produtores de toxina Shiga (STEC) ou *E. coli* produtora de Verotoxina (VTEC) e são considerados importantes patógenos de origem alimentar (PATON & PATON, 1998). Essas bactérias podem causar doenças graves em humanos, como colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (PATON & PATON, 1998). Especificamente, o isolado B41 ainda apresentou em seu antibiograma resistência à 7 dos 20 antimicrobianos testados, sendo eles Amoxicilina (AMO), Cefalexina (CFE), Vancomicina (VAN), Cefalotina (CFL), Cefazolina (CFZ), Eritromicina (ERI) e Teicoplanina (TEC), e o genes de resistência antimicrobiana para Tetraciclina, *Tet (A)*, *Tet (B)*. Semelhante ao presente estudo, Martínez-Vázquez et al. (2018) no México, em amostras de carne suína e bovina, encontraram 3 isolados de *E. coli* que apresentavam o gene de *Stx 1*. Os mesmos autores ainda detectaram a presença dos genes *Tet (A)*, *Tet (B)* em 20.6% dos isolados.

A multirresistência (MDR) foi classificada de acordo com Magiorakos et al. (2012). No presente estudo foi detectada em 7/19 (36,8%) dos isolados de *E. coli* (Tabela 08). Estes resultados

de multirresistência foram confirmados com aqueles obtidos por Rigobelo et al. (2008). Eles encontraram um perfil de MDR de 33% em isolados de *E. coli* isolados de carcaça bovina em um frigorífico na cidade de São Paulo. Dentre os isolados citados acima, apenas um apresentou o gene de virulência *Eae* e *Tir* (B2), para o *Stx* 1 (B8 e B41) e *Hly*<sub>a</sub> (B43). Martínez-Vázquez et al. (2018) também encontraram um resultado semelhante ao presente estudo na qual foi detectado a MDR em 92,4% das cepas de *E. coli* oriundas de carne suína e bovina no México. A demonstrada detecção de *E. coli* STEC no ambiente de abate de bovinos deste estudo, também vai de encontro à normativa nº60 de 2018 do MAPA, e evidencia o potencial risco de contaminação das carcaças a partir destes ambientes.

As cepas B43 e B60 apresentaram o gene *Hly*<sub>a</sub>. Esse gene é responsável pelo rompimento das células pela criação de poros na membrana da célula alvo e afeta eritrócitos, leucócitos e células tubulares renais (KEANE et al., 1987; BHAKDI et al., 1989). Sendo que B43 ainda apresentou os genes de resistência antimicrobiana *Sul* I, *Tet* (B), apresentando em seus fenótipos resistências no antibiograma para Tetraciclina e Sulfonamida. Tal como este trabalho Damer (2016), encontrou em 11,5% dos isolados de *E. coli* a presença do gene *Hly*<sub>a</sub> em carne moída bovina *in natura* na região sul do Brasil.

Os demais isolados, não apresentaram nenhum dos genes de virulência pesquisados neste estudo (B7, B13, B20, B23, B25, B26, B29, B33, B34 e B50). Porém, com exceção dos isolados B25 e B33, os isolados apresentaram importantes genes de resistências antimicrobiana como *Cmla*, *Aaa(3)-I* e *Tet* (B). Esses genes, com exceção do isolado B23 que apresentou resistência a Tetraciclina, não apresentaram resultados de resistências no antibiograma, mas o PCR demonstra que o gene se encontra presente. O isolado B23 apresentou em seu antibiograma resistência para 14 dos 20 antimicrobianos testados, sendo eles o Ácido nalidíxico (NAL), Amoxicilina (AMO), Ampicilina (AMP), Cefalexina (CFE), Cefalotina (CFL), Cefazolina (CFZ), Ciprofloxacina (CIP), Doxiciclina (DOX), eritromicina (ERI), Neomicina (NEO), Sulfonamida (SUL), Teicoplanina (TEC), Tetraciclina (TET) e Vancomicina (VAN). Esse resultado demonstra que mesmo não apresentando genes de virulência, isolados de *E. coli* podem se tornar uma possível fonte de contaminação e disseminação de resistência antimicrobiana nesta região.

Os resultados acima descritos são pioneiros, já que não existem outros estudos na região do Distrito Federal e Goiás que tenham realizados a pesquisa de genes de virulência, genes de resistência aos antimicrobianos e antibiograma em isolados de *E. coli* oriundos de utensílios e ambiente de abatedouro frigorífico de bovinos, sendo esse o primeiro relato.

Na Tabela 09 encontram-se distribuídos os resultados individuais para detecção de marcadores gênicos de virulência, genes de resistência antimicrobiana e fenótipo do antibiograma

para os isolados obtidos dos abatedouros frigoríficos de aves. Encontram-se também nesta tabela as áreas e ou ambientes em que os mesmos foram detectados.

Tabela 09 Resultados individuais, por isolado, de detecção dos marcadores gênicos de virulência, dos genes de resistência antimicrobiana e do antibiograma, obtidos dos abatedouros frigoríficos de aves localizados no estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).

Isolados de <i>E. coli</i> com suas respectivas identificações	Região da localização da indústria	Local de obtenção do isolado dentro da indústria	Gene de resistência antimicrobiana	Drogas Resistentes no Antibiograma	Multirresistente <sup>1</sup>	Genes de virulência
A14	DF	Ralo área limpa	<i>Tet (A), Sul 1, AmpC</i>	NAL, SUL, TEC, TET, VAN	X	0
A19	DF	Chute passagem dos cortes frangos	0	ERI, TEC, VAN		0
A30	DF	Mesa de aço inox inspeção da carcaça	<i>AmpC, aaa(3)-I</i>	ERI, TEC, VAN		<i>Stx 1</i>
A37	DF	Gancho de pendura de carcaça	<i>Sul 1, AmpC, Tet (B),</i>	TEC, VAN		0
A39	DF	Máquina lavagem moela	<i>Tet (B), AmpC, aaa(3)-I</i>	NAL, AMO, AMP, CFL, CFE, CIP, ENO, EST, GEN, SUL, TEC, VAN	X	0
A40	DF	Esteira de cortes de frango	<i>Cmla</i>	ERI, TEC, VAN		0
A41	GO	Máquina lavagem coração	<i>Cmla, AmpC</i>	NAL, AMO, AMP, CFL, CFZ, CAZ, CLO, EST, SUL, TEC, TET, VAN	X	<i>Hly<sub>a</sub></i>
A42	GO	Ralo área limpa	<i>Sul1, AmpC</i>	NAL, AMO, AMP, CFL, CIP, ENO, EST, SUL, TEC, TET, VAN	X	<i>Hly<sub>a</sub></i>
A44	GO	Esteira de cortes de frango	<i>Cmla, AmpC</i>	NAL, AMO, CFL, CFZ, SUL, TEC, VAN	X	<i>Hly<sub>a</sub></i>
A45	GO	Chute - Direcionador de resíduos não comestíveis	<i>AmpC, Tet (B),</i>	EST, TEC, VAN		0
A46	GO	Esteira de cortes de frango	<i>AmpC</i>	CFE, CFZ, TEC, VAN		0
A47	GO	Ralo área limpa	<i>Tet (B), Tet (A)</i>	AMO, AMP, ERI, TEC, VAN	X	0

A48	GO	Esteira de cortes de frango	<i>Tet (B), AmpC</i>	NAL, CFZ, DOX, ERI, EST, TEC, TET, VAN	X	0
A49	GO	Ralo área limpa	<i>AmpC</i>	ERI, SUL, TEC, VAN	X	<i>Stx 1</i>
A50	GO	Ralo área limpa	<i>Tet (A), Cmla, AmpC</i>	TEC, TET, VAN		0
A52	GO	Calha embalagem	<i>Tet (B), Cmla</i>	NAL, CIP, ERI, ENO, EST, SUL, TEC, TET, VAN	X	0
A55	GO	Esteira de cortes de frango	<i>AmpC</i>	NAL, CFZ, CFE, CFL, DOX, EST, GEN, NEO, SUL, TEC, TET, AMO, AMP, VAN	X	<i>Stx 1</i>
A56	GO	Esteira de cortes de frango	<i>AmpC</i>	AMO, AMP, VAN, CLO, ERI, SUL, TEC	X	<i>Eae, Tir Beta</i>
A57	GO	Chute passagem dos cortes frangos	<i>Tet (B), Sul 1, AmpC</i>	NAL, CIP, ENO, EST, SUL, TEC, VAN	X	0
A60	GO	Esteira de cortes de frango	<i>Tet (A)</i>	NAL, AMO, AMP, CFL, CFZ, DOX, ERI, NEO, SUL, TEC, TET, VAN	X	<i>Stx 1</i>
A62	GO	Chute- CMS	<i>AmpC, Tet (B)</i>	NAL, AMO, AMP, CFL, CFZ, CIP, ENO, SUL, TEC, TET, VAN	X	0
A64	GO	Chute - Direcionador de resíduos não comestíveis	<i>sul1, AmpC</i>	ERI, TEC, VAN		<i>Saa</i>
A65	GO	Chute - Direcionador de resíduos não comestíveis	<i>AmpC</i>	NAL, CFL, CFZ, EST, SUL, TEC, TET, VAN	X	0
A66	GO	Direcionadores resíduos comestíveis	<i>AmpC</i>	TEC, VAN		0
A67	GO	Ralo área limpa	<i>AmpC</i>	ERI, TEC, VAN		<i>Stx 1</i>
A68	GO	Esteira de cortes de frango	<i>Tet (B)</i>	TEC, VAN		0
A69	GO	Calha embalagem	<i>AmpC</i>	NAL, AMO, AMP, CFE, CFL, CFZ, TEC, VAN	X	0

A70	GO	Ralo área limpa	<i>Cmla, Tet (B)</i>	NAL, ERI, TEC, VAN	X	0
A71	GO	Ralo área limpa	<i>Tet (A), AmpC, aaa(3)-I</i>	ERI, TEC, VAN		0
A73	GO	Ralo área limpa	<i>Tet (A), Tet (B)</i>	CIP, ERI, TEC, VAN	X	0
A74	GO	Calha embalagem	<i>Cmla, AmpC</i>	NAL, AMO, AMP, CFL, CIP, ENO, NEO, SUL, TEC, VAN	X	<i>Hlya, Stx 1</i>
A75	GO	Direcionadores resíduos comestíveis	<i>Tet (B), Sul 1, Tet (A)</i>	NAL, TEC, VAN		<i>Stx 1</i>
A76	GO	Parede área limpa	<i>Tet (B)</i>	ERI, TEC, VAN		0
A77	GO	Chute- CMS	<i>Sul1, Tet (A), AmpC</i>	NAL, ERI, TEC, VAN		<i>Saa</i>
A78	GO	Direcionadores resíduos comestíveis	<i>Tet (A), Cmla, AmpC</i>	NAL, DOX, EST, TEC, VAN	X	<i>Eae</i>
A79	GO	Esteira de cortes de frango	<i>Tet (B), Tet (A), Sul 1</i>	NAL, AMO, AMP, CFE, CFL, CFZ, CIP, EST, GEN, SUL, TEC, TET, VAN	X	0
A80	GO	Esteira de cortes de frango	<i>Tet (A), AmpC</i>	NAL, ERI, SUL, TEC, TET, VAN	X	<i>Stx 1</i>
A83	GO	Esteira de cortes de frango	<i>Sul 1</i>	NAL, AMO, AMP, CFE, CFL, CFZ, CIP, DOX, ERI, ENO, EST, GEN, SUL, TEC, TET, VAN	X	0
A88	GO	Chute passagem dos cortes frangos	<i>Tet (A), Sul 1, AmpC</i>	NAL, CIP, ERI, ENO, TEC, VAN	X	0
A90	GO	Chute- CMS	<i>Sul 1, AmpC</i>	NAL, AMO, AMP, CFE, CFL, CFZ, ENO, EST, SUL, TEC, VAN	X	0
A105	DF	Ralo área limpa	0	CFE, CFZ, ERI, TEC, VAN	X	0
A106	DF	Esteira de cortes de frango	<i>AmpC, aaa(3)-I</i>	NAL, AMO, AMP, CFE, CFL, CFZ, ERI, TEC, VAN	X	<i>Stx 1</i>

A111	DF	Ralo área limpa	<i>AmpC</i>	ERI, TEC, VAN		0
A119	DF	Esteira de cortes de frango	<i>Tet (A), AmpC, Tet (B)</i>	ERI, SUL, TEC, VAN	X	0
Total de isolados	44					

<sup>1</sup> isolados classificados como multirresistentes de acordo Magiorakos et al. (2012)

Dos 44 isolados obtidos dos abatedouros frigoríficos de aves, o gene marcador de virulência *Stx 1* foi o mais detectado, sendo que os isolados A55, A60, A74, A80 e A106, além de apresentarem o gene *Stx 1*, também apresentaram resistência antimicrobiana a 14, 12, 10, 16 e 9 respectivamente, sendo considerados bactéria multirresistentes. Esses isolados ainda apresentaram os genes de resistência antimicrobiana como o Clorafenicol (*Cmla*) e Ampicilina (*AmpC*) para o isolado A74, Tetraciclina (*Tet A*) e Ampicilina (*AmpC*) para A80, Gentamicina (*Aaa(3)-I*) e Ampicilina (*AmpC*) para A106. Kennedy et al. (2017) também detectaram conjuntamente em *E. coli* produtoras de Shiga like toxina, em bovinos de abatedouros na Irlanda, genes de resistência antimicrobiana e antibiograma. Os autores encontraram resistência a Sulfonamida (99%), Tetraciclina (82%), Ampicilina (53%); Cefalotina (31%). neomicina (26%), Clorafenicol (5%), Gentamicina (2%); Ciprofloxacina (0%) e Ácido Nalidíxico (0%). Para os genes de resistência esses autores também encontraram *ampC* sendo o gene mais detectado com 43%, seguido do *Tet (A)* com 38% e *Sul 1* com 30%.

O isolado A83 apresentou resistência a um maior número de antimicrobianos em seu antibiograma. No total foram encontrados 16 antimicrobianos resistentes dos 20 testados no presente estudo. Das quais eram o Ácido nalidíxico, Amoxicilina, Ampicilina, Cefalexina, Cefalotina, Cefazolina, Ciprofloxacina, Doxiciclina, Eritromicina, Enrofloxacina, Estreptomicina, Gentamicina, Sulfonamidas, Teicoplanina, Tetraciclina e Vancomicina. Esse isolado ainda apresentou o gene de resistência a *Sul 1*. Conclui-se que o A83 é um isolado de difícil tratamento devido a sua resistência aos antimicrobianos. Adenipekun et al. (2015) detectaram entre 517 isolados de *E. coli* oriundas de amostras fecais de bovinos, frangos e suínos saudáveis na Nigéria uma cepa resistente a 13 diferentes antimicrobianos.

O segundo gene marcador de virulência que foi detectado em maior quantidade foi o *Hly<sub>a</sub>*. dos 44 isolados, 4 apresentaram esse gene. Sendo eles os isolados A41, A42, A44 e o A74. Esse último como visto no parágrafo anterior também continha o gene *Stx 1*. Os isolados A41, A42 e A44 apresentaram resistência antimicrobiana a 11, 10 e 7 drogas, respectivamente. O isolado A41, apresentou o gene de resistência ao cloranfenicol (*Cmla*), e expressou resistência à essa droga em seu antibiograma. É importante ressaltar que o uso deste antimicrobiano foi proibido no Brasil para uso

na produção animal no ano de 2003 (BRASIL, 2003) e mesmo assim, a presença desta resistência foi detectada. Corroborando com esse resultado, Gozi et al. (2019) encontraram o gene *cmlA* em 85,9% dos isolados de *E. coli* oriundos de cordeiros durante o confinamento em São Paulo. Um outro estudo realizado antes da proibição pela normativa citada acima, Brito & Tagliari, (2000) no Estado do Paraná em *E. coli* isolados de leitões lactentes com diarreia verificaram que 43,3% dos isolados apresentaram resistência ao cloranfenicol pelo antibiograma.

O isolado A56, foi o único a apresentar ambos os genes *Eae*, que codifica a Intimina, e *Tir*  $\beta$ . Esses genes são importantes na interação de *E. coli* STEC patogênica nos enterócitos (FRANKEL et al., 1998). Esse mesmo isolado ainda apresentou o gene de resistência a ampicilina (*AmpC*), conferindo o fenótipo de resistência no antibiograma para a Ampicilina (AMP). A56 ainda apresentou resistência a Amoxicilina (AMO), Vancomicina (VAN), Cloranfenicol (CLO), Eritromicina (ERI), Sulfonamida (SUL) e Teicoplanina (TEC). Minh et al. (2015) encontraram em 20% dos seus isolados, oriundos de carne *in natura* no Japão, a presença do gene *Eae*. Diferente do presente estudo, Tanih et al. (2015) não encontraram o gene *Eae* em isolados de *E. coli* oriundo de carcaças de bovino e suínos abatidos na África do Sul.

Desta forma os isolados deste estudo evidenciaram a presença de genes de virulência e resistências importantes para a saúde pública. Foi detectado também a presença de isolados multirresistentes com potencial risco para a saúde pública. Esses resultados demonstram a importância da inspeção na detecção desse microrganismo nas indústrias de produção de alimentos de origem animal.



## 7.7 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA DE ISOLADOS DE *Escherichia coli*

Foi realizado o sequenciamento total do genoma em três (03) isolados de *E. coli* obtidos de ambiente e utensílios de abatedouros frigoríficos, sendo dois isolados de abatedouros frigoríficos de aves (A56 e A64) e um de abatedouro frigorífico de bovino (B2). Os resultados se encontram na Tabela 10.

Tabela 10 Análises do sequenciamento completo do genoma (WSG) dos isolados de *E. coli* oriundos de ambientes e utensílios de abatedouros frigoríficos bovinos e de aves localizados no Estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).

Identificação do isolado	Região de isolamento	Local de isolamento	Número de acesso no Genebank	Genes de resistência	Mutação	Plasmídeos	Genes de virulência	Sorotipo	ST
<b>B2</b>	DF	Ralo da sala de abate de bovino	JAAVKQ000000000.1	tet(B); aac(3)-VIa, aadA1, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib; mdf(A); gyrA-83L; sul2;	-	Col(BS512)-like	nleB2, cif, nleG7, ompA, papB, papI, entB, gspM, yagW/ecpD, yagX/ecpC, yagY/ecpB, yagZ/ecpA, fimE, fimI, fimC, fimD, fimG, eae, espA, espB, gad, ireA, mchF, tir	O177:H28	ST752
<b>A56</b>	GO	Esteira de cortes de frango	JAAXQC010000000	aadA1, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id; mdf(A); sul2;	parE (S458A), gyrA (S83L) gyrA (D87N) parC (S80I)	ColpVC-like IncY-like	astA, cif, eae, espA, espB, gad, ireA, mchF, nleA, nleB, tir	O177:H28	ST752
<b>A64</b>	GO	Chute - Direcionador de resíduos não comestíveis	JAAVKR000000000.1	blaCTX-M-8; aph(6)-Ic, aac(3)-IIa, aadA1; mdf(A); qnrB19	-	IncII	entB, gspM, fimD, fimC, fimI, yagW/ecpD, yagX/ecpC, yagY/ecpB, yagZ/ecpA, astA, fimE, gad	O71:H48	ST10

Na análise dos resultados dos sequenciamentos completos do genoma dos 03 isolados verificou-se que os isolados B2 e A56 foram identificados com o sorotipo O177:H28 e o isolado A64 com O71:H48. Lindsey et al. (2016) sequenciaram e analisaram o genoma completo de 188 isolados de *E. coli* nos Estados Unidos e não encontraram o antígeno somático O177. No entanto foram detectados a presença de 7 isolados H48 e 4 isolados H28. Montso et al. (2019) encontraram em 376 isolados de *E. coli* o sorotipo O177 em amostras oriundas de bovinos na África do Sul. O tipo dos antígenos O (somático) e H (flagelar) presentes na superfície da bactéria são importantes fatores de virulência, pois definem a interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e a patogenicidade do microrganismo. Além disso, a designação desses sorogrupos é importante para vigilância epidemiológica e rastreamento em surtos de doenças (DEBROY et al., 2011). Esses sorotipos ainda não foram relatados em outros estudos no Distrito Federal e Goiás, sendo novamente esse trabalho o primeiro relato realizado nessa região.

Em relação aos resultados dos sequenciamentos completos do genoma para os genes de resistência antimicrobiana, foi confirmado a presença do gene *Tet* (B) no isolado B2, que foi encontrado previamente por análise da PCR. Não foi encontrado por PCR os genes de resistência *BlaSHV*, *Tet* (A, C e M), *Cat 1*, *Cmla* e *Aac(3)-I* nos três isolados (B2, A56 e A64). Esse resultado foi confirmado pelo sequenciamento total do genoma na qual também não se verificou a presença desses genes.

Todos os isolados apresentaram o gene *Mdf(A)*, *aph(3'')-Ib* e *aadA1*, os quais podem apresentar resistência à fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Corroborando com esse achado, Adzitey et al. (2019), encontraram esse gene sendo o mais comum em isolados de *E. coli* de diferentes tipos de carne na região de Gana. Rafique et al. (2020) também encontraram esse gene em 100% dos isolados de *E. coli* oriundos de fígados de frangos abatidos na região do Paquistão. Já Ojdana et al. (2017) encontraram o gene *aph(3'')-Ib* em 36.2% de isolados de *E. coli* na Polônia. Já para o gene *aadA1*, corroborando também com o presente estudo, Furlan et al. (2019) realizaram o sequenciamento total do genoma em uma cepa de *E. coli* isolada em São Paulo e encontraram a presença deste gene. Bactérias que expressam Mdf (A) demonstram resistência a compostos catiônicos, como o brometo de etídeo, rifampicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, fluoroquinolonas e certos aminoglicosídeos. (EDGAR & BIBI, 1997) e a presença do gene *aph(3'')-Ib*, e gene *aadA1* levam a resistência contra os aminoglicosídeos (OJDANA et al., 2017; FURLAN et al., 2019).

O gene *Sul2* foi detectado nos isolados B2 e A56, e confere resistência às sulfonamidas. Semelhante ao presente estudo, Wu et al. (2010) encontraram a presença desse gene em 65% de *E. coli* isolados de carcaças de suínos, fezes de suínos e humanos na Dinamarca, Assim como no presente estudo, Mbelle et al. (2019) também realizaram o sequenciamento total do genoma em

isolados clínicos de *E. coli* multirresistentes em Pretória, África do Sul e encontraram o gene em 65% dos isolados.

O isolado B2 apresentou um perfil de resistência diferente das demais com a presença de mutação no *gyrA-83L*, que confere resistência à quinolonas. Originalmente essa mutação ocorre devido a mutações cromossômicas nas regiões dos genes *gyrA*, que codificam as subunidades da girase A (PAIVA et al., 2012). Esse isolado apresentou duas mutações do *gyrA*, sendo ela *gyrA* (S83L) *gyrA* (D87N). Um estudo realizado por Minarini & Darini (2012) em isolados de *Enterobacteriaceae* na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, foi encontrado em todos os isolados de *E. coli* resistentes à fluoroquinolona a presença dessa substituição Ser83-Leu no gene *gyrA*. Mbelle et al. (2019) na África do sul também encontraram essa mutação, sendo que a *gyrA* também tinha duas mutações. Elas, porém, foram classificadas como A828S e D678E

O isolado A64 apresentou os genes *blaCTX-M-8* e *QnrB19*. O primeiro denominado *blaCTX-M-8*, uma Beta Lactamase de espectro estendido (ESBL) e já foi encontrado no Brasil em diferentes locais como em cordeiros em confinamento na região Sudeste (GOZI et al., 2019), em isolados humanos no Rio de Janeiro (BONNET et al., 2000), na microbiota intestinal de frangos de corte saudáveis, produzidos em fazendas do Estado de São Paulo (FERREIRA et al., 2014), em bovinos na região nordeste do país (PALMEIRA et al., 2020), em carne de frango no Rio de Janeiro (BOTELHO et al., 2015), em búfalo em São Paulo e Paraná (AIZAWA et al., 2014). Porém, é a primeira vez que a sua presença é relatada em ambiente de abatedouro frigorífico de aves na região de Goiás.

O segundo gene é mediado por plasmídeo e é denominado *QnrB19*. Ele confere resistência à quinolona. Nenhuma mutação nos genes cromossômicos, associado à resistência à quinolona, *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* e *rpoB* foram encontrados no isolado A64.

Neste estudo foram realizadas a pesquisa para os seguintes genes de virulência por PCR: *Eae*, *Tir*, *Stx 1*, *Stx 2*, *Saa* e *Hly<sub>a</sub>*. Os genes *Eae* e *Tir* foram detectados previamente por PCR nos isolados B2 e A56 e confirmados a presença por sequenciamento total do genoma. Os genes *Stx 1*, *Stx 2* e *Hly<sub>a</sub>* não foram encontrados nos 3 (três) isolados e a ausência foi confirmada pelo sequenciamento total do genoma.

O isolado B2 apresentou 24 genes de virulência tendo o maior repertório de genes de virulência, A64 com 12 diferentes genes de virulência e o isolado A56 com 11 genes de virulência obteve a menor quantidade.

O gene de virulência comum entre as cepas foi o *Gad*. Corroborando com o presente estudo, Mbelle et al. (2019) encontraram esse gene em 17 isolados de *E. coli* na África do Sul. Rodriguez-Villodres et al. (2019) detectaram tal gene em 86.6% dos isolados de *E. Coli* na Espanha. Esse gene

corresponde a enzima glutamato descarboxilase, que auxilia no mecanismo de patogênese das lesões A/E (*Attaching and Effacing*) característica da *E. coli* enteropatogênica EPEC (BRAUN et al., 2017).

Os isolados A56 e B2 apresentaram o gene *Cif*, que é uma toxina bacteriana capaz de modular o ciclo da célula hospedeira, retardando a apoptose celular (SAMBA-LOUAKA et al., 2009). Essas cepas (A56 e B2) também apresentaram o gene *ireA*, indicando a presença de receptores TonB-dependentes (TBDRs), que são proteínas ubíquas da membrana externa e participam do reconhecimento durante a absorção de ferro (ZHANG et al., 2020). Mbelle et al. (2019) encontraram o gene *ireA* em apenas um isolado na África do Sul. Rodriguez-Villodres et al. (2019) encontraram tal gene em 6,6% na Espanha.

Os isolados A56 e A64 apresentaram o gene *AstA*, responsável por codificar a enterotoxina termoestável (EAST1) em *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (MALUTA et al., 2016). Mbelle et al. (2019) também encontraram esse gene em dois isolados de *E. coli* na África do Sul.

No presente estudo foram encontrados diferentes tipos de plasmídeos, sendo eles o Col(BS512) no isolado B2, ColpVC e IncY no isolado A56 e IncI1 no isolado A64. Mbelle encontraram em 5 isolados o plasmídeo Col(BS512), em um isolado o ColpVC e IncY em três isolados. Col(BS512) é conhecido como o plasmídeo pBS512 isolada em *Shigella boydii* e é categorizado como um plasmídeo invasivo com relação ao sistema de secreção tipo três (T3SS) (JOHNSON & NOLAN, 2010).

Na análise dos resultados da tipagem de sequências de multilocus (MLST) verificou-se que os isolados B2 e A56 pertencem ao tipo ST752 e o isolado A64 ao tipo ST10. Esse primeiro filotipo (ST752) já foi descrito, segundo Bortolaia et al. (2011) entre *E. coli* comensais e patogênicos isolados de humanos, diferentes aves e mamíferos, que por sua vez corroboram com a descrição destes filotipos na região do presente estudo. Bortolaia et al. (2011) encontraram em seus estudos a presença do filotipo ST752 em aves saudáveis na Dinamarca. O filotipo ST10 também já foi descrito em isolados de *E. coli* uropatogênicos (UPEC) na Inglaterra (GIBREEL et al., 2011), em amostras clínicas de diferentes hospitais na Espanha (OTEO et al., 2009) e em isolados de *E. coli* oriundos de aves e infecção do trato urinário em humanos (GIUFRÈ et al., 2012). ZHANG et al. (2018) encontraram esses dois filotipos, ST752 e ST10, sendo o mais prevalente em amostras de *E. coli* oriundas de alimentos em mercados na China.

Os sequenciamentos completos dos genomas evidenciaram que os três isolados apresentam importância significativa para a saúde pública, tendo em vista os genes de virulência e de resistência antimicrobiana presentes em seus genomas. Os resultados mostrados acima são as primeiras descrições destes sorotipos na região.

## 7.8 PESQUISA DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO* DE ISOLADOS DE *Escherichia coli*

Os resultados do teste de capacidade de formação de biofilme dos isolados de *E. coli* se encontram na Tabela 11.

Tabela 11 Resultados do teste de capacidade de formação de biofilmes *in vitro*, em microplaca de poliestireno, dos 5 isolados de *E. coli* oriundos de ambientes e utensílios de abatedouros frigoríficos bovinos e de aves localizados no estado de Goiás (GO) e Distrito Federal (DF).

Identificação do isolado	Região de isolamento	Local de isolamento	DOi a 37°C	Classificação
B2	DF	Ralo da sala de abate de bovino	0,048	Fraco
B43	GO	Caixa plástica branca de bovino	0,043	Não formador
A56	GO	Esteira de cortes de frango	0,044	Não formador
A74	GO	Calha embalagem de frango	0,043	Não formador
A77	GO	Chutes – CMS de frango	0,048	Fraco

Classificado de acordo a classificação proposta por Stepanović et al., (2000); DOi: densidade óptica do isolado; Parâmetros de classificação segundo Stepanović et al. (2000): não formador =  $DOi \leq DOn$ ; formador fraco =  $DOn < DOi \leq 2xDOn$ . O valor de densidade óptica do controle negativo (DOn): DOn a 37°C: 0.045.

Os resultados realizados de acordo com protocolo descrito por Djordjevic et al. (2002) ( $DOn < DOi \leq 2xDOn$ ), demonstraram que dois (02) (B2 e A77) dos cinco (05) isolados (40%) tiveram a formação de biofilme classificada como fraca, com 24 horas de incubação sob a temperatura de 37°C. O restante dos isolados (A56, B43 e A74) foram classificados como não formadores de biofilmes na temperatura de incubação a 37°C, por 24h.

Alguns autores apresentaram resultados de pesquisas de formação de biofilme em *E. coli* que são similares aos obtidos neste trabalho. Tiba et al. (2009) em estudos realizados em isolados de amostras de humanos, em Campinas-SP, verificaram que em 56% das *E. coli* apresentaram resultado de ausente/fraco para formação de biofilmes. Rodrigues et al. (2010), em estudo na sala de corte de um abatedouro de aves no sul do Brasil, também não encontraram *E. coli* com a classificação de não formadora de biofilmes. Entretanto, eles detectaram a presença de *E. coli* formadora fraca em 3 isolados, formação moderada em 4 e formação forte de biofilmes em 3 isolados.

Os dados obtidos neste estudo quanto à formação de biofilme são de grande importância para a saúde pública devido ao fato delas demonstrarem que a *E. coli* isolada de ambientes da indústria, tais como ralo da sala de abate de bovino e Chutes – CMS de frango, podem produzir biofilmes, mesmo que classificados como formadoras fracas. Esse fato pode causar a persistência destes microrganismos na indústria durante o processamento de alimentos e, conseqüentemente serem fontes de contaminação na indústria.

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo detectaram a presença de *Escherichia coli* em diferentes pontos dentro da indústria de abatedouro frigoríficos de bovino e de aves na região do Distrito Federal e Goiás. Foi demonstrado a possibilidade de contaminar as carcaças e a planta da indústria, levando a uma contaminação cruzada dentro dos abatedouros frigoríficos e gerando um potencial risco para o consumidor final e para saúde pública.

Foi observado a presença de genes marcadores de virulência em alguns isolados de *E. coli*, sendo o *Stx 1* o mais presente nestes microrganismos. Foi observado também a presença de resistência antimicrobiana, através da detecção de genes de resistência antimicrobiana e através do antibiograma. Esta resistência foi observada nos isolados de *E. coli* com marcadores de virulência, e em isolados que não apresentaram genes marcadores de virulência, demonstrando que estas bactérias podem promover a disseminação de resistência no ambiente.

O sequenciamento completo do genoma permitiu descrever pela primeira vez os sorotipos O177:H28 e O71:H48 circulando na região, e a descrição dos filotipos ST752 e ST10, e ainda pode-se observar uma capacidade de formação de biofilme em alguns isolados.

Desta forma, este trabalho contribui com informações importantes e originais para a região do estado de Goiás e do Distrito Federal em relação à circulação da resistência antimicrobiana, dos genes de resistência e marcadores de virulência, que por sua vez demonstram a importância da inspeção na detecção desse microrganismo nas indústrias de produção de alimentos de origem animal.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M.; AGERSO, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M.; JENSEN, L. B. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2000, vol. 37. p. 127-37.
- AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C.; COLLIGNON, P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 6, 2008.p. 733-750.
- ABDISSA, R.; HAILE, W.; FITE, A. T.; BEYI, A. F.; AGGA, G. E.; EDAO, B. M.; TADESSE, F., KORSA, M. G.; BEYENE, T.; BEYENE, T. J.; DE ZUTTER, L.; COX, E.; GODDEERIS, B. M. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle at slaughter and beef carcasses at retail shops in Ethiopia. *BMC infectious diseases*, 2017. 17(1), 277.
- ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Beef report – Perfil da pecuária no Brasil 2020. Acesso em 21 de maio de 2020. Disponível em: <http://abiec.com.br/abiec-lanca-beef-report-2020/>
- ABPA – associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual 2020. Acesso em 21 de maio de 2020. Disponível em: [http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa\\_relatorio\\_anual\\_2020\\_portugues\\_web.pdf](http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf).
- ABREU, D. L. C.; FRANCO, R. M.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, VIRGINIA, L. A.; ALVES, F. M. X.; ALMEIDA, J. F. Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção do gene ISS pela reação em cadeia da polimerase na tipificação de *Escherichia coli* patogênica em codornas de corte sob inspeção sanitária. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(5), 2010. 406-410
- ADENIPEKUN, E. O.; JACKSON, C. R.; OLUWADUN, A.; IWALOKUN, B. A.; FRYE, J. G.; BARRETT, J. B.; HIOTT, L. M.; WOODLEY, T. A. Prevalence and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Food Animals in Lagos, Nigeria. *Microbial Drug Resistance*, 2015. 21(3), 358–365.
- ADZITEY, F.; ASSOAH-PEPRAH, P.; TEYE, G. A. Whole genome sequencing of *Escherichia coli* isolated from contaminated meat samples collected from the Northern Region of Ghana revealed the presence of multidrug resistant genes. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 18. 2019. 179–182.
- AIZAWA, J.; NEUWIRT, N.; BARBATO, L.; NEVES, P. R.; LEIGUE, L.; PADILHA, J., CASTRO, A, F, P.; GREGORY, L.; LINCOPAN, N. Identification of fluoroquinolone-resistant extended-spectrum -lactamase (CTX-M-8)-producing *Escherichia coli* ST224, ST2179 and ST2308 in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(10), 2014. 2866–2869.
- ALMEIDA, M.P.; REZENDE, C.P.; SOUZA, L.F.; BRITO, R.B. Validation of a quantitative and confirmatory method for residue analysis of aminoglycoside antibiotics in poultry, bovine, equine, and swine kidney through liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants – Part. 1*. Londres, v. 29, n.4, 2012.p.517-525.

ALONSO, M. Z.; LUCCHESI, P. M. A.; RODRÍGUEZ, E. M.; PARMA, A. E.; PADOLA, N. L. Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. **Food Control**, 2012. 23(2), 351–355.

ALTERTHUM, C.L.; TRABULSI, L. R. Microbiologia. 6st ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte: Editora Atheneu; 2015. 920p

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos, bases teóricas e uso clínico. 2007. Acesso em 16 de junho de 2020. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/conceitos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm)>.

ATNAFIE, B.; PAULOS, D.; ABERA, M.; TEFERA, G.; HAILU, D.; KASAYE, S.; AMENU, K. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle feces and contamination of carcass and various contact surfaces in abattoir and butcher shops of Hawassa, Ethiopia. **BMC microbiology**, 2017. 17(1), 24.

BAGHERI, M.; GHANBARPOUR, R.; ALIZADE, H. Shiga toxin and beta-lactamases genes in *Escherichia coli* phylotypes isolated from carcasses of broiler chickens slaughtered in Iran, **International Journal of Food Microbiology**, vol. 177, 2014.pp. 16–20.

BARDIAU, M.; SZALO, M.; MAINIL, J. G. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. **Vet. Res**, 2010. 41-57.

BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; MONTEIRO, A. A.; BELOTI, V. Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. vol.27, n.4. 2007. p.856-862.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E. Antibiothérapie des infections urinaires basses: bases cliniques, microbiologiques et pharmacologiques. **Antibiotiques** 2006;8(1):51-62.

BEZERRA, W. G. A.; SILVA, I. I. N. G.; VASCONCELOS, R. H.; MACHADO, D. N.; LOPES, E. S. P.; LIMA, S. V. G.; TEIXEIRA, R. S. C.; LIMA, J. B.; OLIVEIRA, F. B.; MACIEL. W. C. Isolation and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* subsp. enterica (O:6,8) in broiler chickens. **Acta. Sci. Vet**. 2016. 44:1–7.

BHAKDI, S.; GREULICH, S.; MUHLY, M.; EBERSPACHER, B.; BECKER, H.; THIELE, A.; HUGO, F. Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. **J. Exp. Med**. 1989.169:737– 754.

BHULLAR, K.; WAGLECHNER, N.; PAWLOWSKI, A.; KOTEVA, K.; BANKS, E. D.; JOHNSTON, M. D.; BARTON, H. A.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **PloS one**, 7(4), 2012 e34953.

BLOCH, K. V.; COUTINHO, E. S. F. Fundamentos da pesquisa epidemiológica. In: Medronho RA. Epidemiologia. São Paulo (SP): Atheneu; 2003.

BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. **Meat Science**, n. 62, 2002.p. 381–390.

BONNET, R.; SAMPAIO, J.L.; LABIA, R.; CHAMPS, C.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil **Antimicrob Agents Chemother**, 44. 2000, pp. 1936-1942.

BORTOLAIA, V.; LARSEN, J.; DAMBORG, P.; GUARDABASSI, L. Potential pathogenicity and host range of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from healthy poultry. **Appl Environ Microbiol**. 2011. 77: 5830–5833

BOTELHO, L. A. B.; KRAYCHETE, G. B.; SILVA, J. L. C.; REGIS, D. V. V.; PICÃO, R. C.; MOREIRA, B. M.; BONELLI, R. R. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **b**. 2015;110: 249–254.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. 1997. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3015>. Acesso em 01 agosto 2020.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular nº 668, de 19 de setembro de 2006. Instituem Diretrizes para preparação de Plano de APPCC para o processo de abate de aves. Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Circular n. 175 de 16 de maio de, 2005. Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole. Brasília: Ministério da Agricultura, 39 p. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular n. 176 de 16 de maio de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, 2005

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular n. 369 de 02 de junho de 2003. Dispõe sobre instruções para elaboração e implantação dos sistemas PPHO e APPCC nos estabelecimentos habilitados à exportação de carnes. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.09, 27 de junho de 2003. Proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 jun. 2003b.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 60, de 20 de dezembro de 2018. **Diário Oficial da União**. Publicado em: 24/12/2018. Edição: 246. Seção: 1. Página: 4

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, 1998. Brasília, DF.

BRASIL. Portaria SVS/MS n.º 1428, de 26 de novembro de 1993. Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos. **Diário Oficial da União**. 1993. Brasília, DF

BRAUN, H.; SPONDER, G.; ASCHENBACH, J. R.; KERNER, K.; BAUERFEIND, R.; DEINER, C. The GadX regulon affects virulence gene expression and adhesion of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* in vitro, **Veterinary and Animal Science**. 3. 2017. 10–17.

BRITO, B.G.; TAGLIARI, K.C. Sensibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões lactentes com diarreia. **Rev. Bras. Cienc. Vet.**, v.7, n.2, p.117-119, 2000.

BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. Bergey's manual of determination bacteriology. 8th. Baltimore: The Williams and wilkins Co; 1994

BUTAYE, P.; ARGUDÍN, M. A.; THRELFALL, J. Introduction to Antimicrobial-Resistant Foodborne Pathogens. In: CHEN, C. Y.; YAN, X.; JACKSON, C. R. **Antimicrobial Resistance and Food Safety: Methods and Techniques**. [S.l.]: Academic Press, 2015. p. 1-15.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet Res**. 2005. 36:289–311

CARATTOLI, A.; VILLA, L.; FEUDI, C.; CURCIO, L.; ORSINI, S.; LUPPI, A.; PEZZOTTI, G.; MAGISTRALI, C. F. Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, 2017. 22(31), 30589.

CARDOSO, A. L. S.; KANASHIRO, A. M. I.; STOPPA, G. F. Z.; CASTRO, G. M.; LUCIANO, R. L.; TESSAR, E. N. C. Avaliação do perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isolada de aves comerciais. **Nutri time**. 2015. Vol. 12, nº 05.

CARVALHO, M. C. N.; JAYME, M. M.; ARENAZIO, G. S.; ARAÚJO, F. V.; LEITE, S. G. F.; DEL AGUILA, E. M. Microbiological Quality Assessment by PCR and its antibiotic susceptibility in Mangrove Crabs (*Ucides cordatus*) from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Microbiology**, 2016. p. 1-9.

CASAGRANDE, M. F. Quantificação de enterobactérias e *Clostridium* spp. e detecção molecular de *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em pontos da cadeia produtiva de carne de frango. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp- obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

CERUTTI, M. F.; VIEIRA, T. R.; ZENATO, K. S.; WERLANG, G. O.; PISSETTI, C.; CARDOSO, M. *Escherichia coli* in Chicken Carcasses in Southern Brazil: Absence of Shigatoxigenic (STEC) and Isolation of Atypical Enteropathogenic (aEPEC). **Braz. J. Poult. Sci.** vol.22 no.1. Epub June. 2020. 05.

CETIN, O.; KAHRAMAN, T.; BUYUKUNAL, S.K. Microbiological evaluation of food contact surfaces at red meat processing plants in Istanbul, Turkey. **Italian Journal of Animal Science**, 5 (3). 2006, pp. 277-283

CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE, B.; TALON, R.; HÉBRAUD, M.; BERNARDI, T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bactéria **J. Microbiol. Methods**, 68. 2007, p. 605-612.

CHIKA, E.; CHIJOKE, E.; IFEANYICHUKWU, I.; JERRY, O.; STANLEY, E.; EMMANUEL, U.; CARISSA, D.; CHARLES E. Antibiogram and detection of metallo-beta-lactamase (MBL) positive *Escherichia coli* isolated from the abattoir. **Nat Sci** 2016;14:65-9.

CHINA, B.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Comparison of eae, tir, espA and esp B genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS microbiology**, 1999. 177-182.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex In Vitro Amplification of Virulence-Associated Genes. **Applied and environmental microbiology**, 1996. 3462–3465.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 30th ed. CLSI supplement M100. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2020.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesq. Vet. Bras.**, Set 2014, vol.34, no.9, p.811-818.

CROXEN, M.A.; LAW, R.J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev** 2013;26:822–880.

DAMER, J. R. S. Características genotípicas e fenotípicas de cepas de *Escherichia coli* isoladas de carne moída bovina in natura. 2016. Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Santa Maria- UFSM – RS. Santa Maria, RS. 2016.

DEBROY, C.; ROBERTS, E.; FRATAMICO, P. M. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. **Animal Health Research Reviews**, 12(02), 2011. 169–185.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2950-2958, 2002.

DONTOROU, A.; PAPADOPOULOU, C.; FILIOUSSIS, G.; ECONOMOU, V.; APOSTOLOU, I.; ZAKKAS, G.; SALAMOURA, A.; KANSOUZIDOU, A.; LEVIDIOTOU, S. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. **Int J Food Microbiol**. 2003; 82: 273-279. 5.

DRUMMOND, V.O.; PERECMANIS, S. Genes de enterotoxinas e perfil antimicrobiano de *Escherichia coli* isoladas de suínos hígidos no Distrito Federal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, 2013. p.1005-1009.

EDGAR R., BIBI E. MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. **J Bacteriol**. 1997 Apr;179(7):2274-80.

EFSA/ECDC. THE EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY/ THE EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. **EFSA Journal**, 2013. v.11, n. 5.

ETCHEVERRÍA, A. I.; PADOLA, N. L.; SANZ, M. E.; POLIFRONI, R.; KRÜGER, A.; PASSUCCI, J. Occurrence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. **Meat Sci.** 2010. 86, 418–421.

EZZAT, M.; WAHDAN, A.; YOUSEF, F.; MUNIER, M. Genetic Variation of *E. coli* Strains Isolated from Poultry Slaughterhouses at Ismailia Governorate, Egypt. **Advances in animal and Veterinary Sciences.** Volume 6. Issue 12. 2018. p 531.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The FAO action plan on antimicrobial resistance 2016-2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5996e.pdf>>. Acesso em 23 de maio 2020.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A.; BURKHARDT, W. Food and Drugs Administration (FDA). Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria, 2002. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm064948.htm>>. Acesso em 25 de maio de 2020.

FERREIRA, J. C.; FILHO, R. A. C. P.; ANDRADE, L. N.; JUNIOR, A. B.; DARINI, A. L. C. IncI1/ST113 and IncI1/ST114 conjugative plasmids carrying blaCTX-M-8 in *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2014;80:304-306.

FERREIRA, M. G. A. B.; SOBRINHO, A. J. C. Avaliação da Qualidade Bacteriológica das Carnes Bovina Moída e Suína (Pernil) in natura e/ou refrigerada, em supermercados, frigoríficos e feiras livres do município de São Luiz, MA. **Higiene Alimentar**, v 17, nº 104/105, 2003.p. 87-93.

FERREIRA, M. R. A.; SILVA, T. S.; STELLA, A. E.; CONCEIÇÃO, F. R.; REIS, E. F.; MOREIRA, C. N. Detection of virulence factors and antimicrobial resistance patterns in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** 2015. 35, 775–780.

FERREIRA, M. R. A.; STELLA, A. E.; FREITAS-FILHO, E. G.; SILVA, T. S.; NASCIMENTO, K. A.; PINTO, J. F. N.; DIAS, M.; MOREIRA, C.N. Distribution of the stx1 and stx2 genes in *Escherichia coli* isolated from milk cattle according to season, age, and production scale in southwestern region of Goiás, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.70, n.6, 2018. p.1807-1813.

FERNANDES, F. P.; VOLOSKI, F. L. S.; RAMIRES, T.; HAUBERT, L.; RETA, G. G.; MONDADORI, R. G.; SILVA, W. P. D.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; Duval, E. H. Virulence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* in the beef jerky production line. **FEMS Microbiol. Lett.** 2017, 364.

FERNÁNDEZ, D.; SANZ, M. E.; PADOLA, N. L. Characterization of shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from newborn, milk-fed, and growing calves in Argentina. **J. dairy Sci.**, v. 95, 2012.p. 5340-5343.

FILHO, A. T. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, J. P.; BUENO, C. P.; LOPES, J. H.; COUTO, M.V.; BORGES, N. M. F. Qualidade bacteriológica de meias-carcaças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do estado de Goiás habilitados para exportação. **Ciênc. Anim. Bras.** 7, 2006. 315– 325.

FOOD SAFETY BRAZIL. Programas de autocontrole para indústrias de alimentos de origem animal – (III). Janeiro 2020. Acesso em 20 de junho de 2020. Disponível em:

<https://foodsafetybrazil.org/programas-de-autocontrole-para-industrias-de-alimentos-de-origem-animal-iii/>

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiol.** 1998. 30:911–921.

FURLAN, J. P. R.; GALLO, I. F. L.; CAMPOS, A. C. L. P.; PASSAGLIA, J.; FALCÃO, J. P.; NAVARRO, A.; NAKAZATO, G.; STEHLING, E. G. Molecular characterization of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* harboring antimicrobial resistance genes obtained from a farmhouse. **Pathogens and Global Health**, 2019. 1–7.

GALARCE, N.; SÁNCHEZ, F.; FUENZALIDA, V.; RAMOS, R.; ESCOBAR, B.; LAPIERRE, L.; PAREDES-OSSES, E.; ARRIAGADA, G.; ALEGRÍA-MORÁN, R.; LINCOPÁN, N.; FUENTES-CASTILLO, D.; VERA-LEIVA, A.; GONZÁLEZ-ROCHA, G.; BELLO-TOLED, H.; BORIE, C. Phenotypic and Genotypic Antimicrobial Resistance in Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated From Cattle and Swine in Chile. **Frontiers in Veterinary Science**, 2020. 7.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic outline of the procaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed., release 5.0. Springer-Verlag, New York, NY. 2004.

GIBREEL, T. M.; DODGSON, A. R.; CHEESBROUGH, J.; FOX, A. J.; BOLTON, F. J.; UPTON, M. Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England. **J Antimicrob Chemother.** 2011. 67: 346–356

GIUFRE, M.; GRAZIANI, C.; ACCOGLI, M.; LUZZI, I.; BUSANI, L.; CERGUETTI, M. *Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. **J Antimicrob Chemother.** 2012. 67: 860–867.

GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P.; SCALETSKY, I. C. A.; GUTH, B. E. C.; RODRIGUES, J. F.; PIAZZA, R. M. F.; FERREIRA, L. C. S.; MARTINEZ, M. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian J. Microbiol.** 2016. 47, 3–30.

GONÇALVES, G.A. M.; ANDREATTI FILHO. R.L. Susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frango industrial (*gallus gallus domesticus - linnaeus*, 1758) com colibacilose **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.4, 2010. p.715-718.

GOZI, K. S.; FROES, J. R.; DEUS, A. L. P. T.; SILVA, C. R.; BAPTISTA, R. S.; PEIRÓ, J. R.; MARINHO, M. MENDES, L. C. N.; NOGUEIRA, M. C. L.; CASELLA, T. Dissemination of multidrug-resistant commensal *Escherichia coli* in feedlot lambs in Southeastern Brazil. **Front Microbiol.** 2019;10:1394.

GUIMARÃES, R.A.; LUGO NETO, D.F.; SARAIVA, M.M.S.; LIMA, R.P.; BARROS, M.R.; COSTA, M.M.; OLIVEIRA, C.B.; STIPP, D.T. Caracterização filogenética molecular e resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de caprinos neonatos com diarreia. **Cienc. Anim. Bras.** 2015. 16(4):615-622.

GYLES C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **J. Anim. Sci.** 2007.85:45-62.



- HO, C. P.; HUANG, N. Y.; CHEN, B. J. A survey of microbial contamination of food contact surfaces at broiler slaughter plants in Taiwan. **Journal of Food Protection**, 67(12), 2004. 2809–2811
- IBRAHIM, R. A.; CRYER, T. L.; LAFI, S. Q.; BASHA, E.; GOOD, L.; TARAZI, Y. H. Identification of *Escherichia coli* from broiler chickens in Jordan, their antimicrobial resistance, gene characterization and the associated risk factors. **BMC Vet Res**. 2019. 15, 159
- IPEA – INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. Inserção no mercado internacional e a produção de carnes no Brasil. Junho 2019. Acesso em 21 de maio de 2020. Disponível em: [http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9285/1/TD\\_2479.PDF](http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9285/1/TD_2479.PDF)
- JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 74, no. 3, 2010. pp. 477-478.
- JO, S. J.; WOO, G. J. Molecular Characterization of Plasmids Encoding CTX-M  $\beta$ -Lactamases and their Associated Addiction Systems Circulating Among *Escherichia coli* from Retail Chickens, Chicken Farms, and Slaughterhouses in Korea. **Journal of microbiology and biotechnology**, 2016. 26(2), 270–276.
- KABIRU, L.M.; BELLO, M.; KABIR, J.; GRANDE, L.; MORABITO, S. Detection of pathogenic *Escherichia coli* in samples collected at an Abattoir in Zaria, Nigeria and at different points in the surrounding environment. **Int J Environ Res Public Health**. 2015;12:679–91.
- KAPER, J.B. Pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.295, 2005. p.355-356.
- KAPER, J. P.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 2004. 123-140.
- KARCZMARCZYK, M.; WALSH, C.; SLOWEY, R.; LEONARD, N.; FANNING, S. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Irish Cattle Farms. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011. 77(20).
- KAUSHIK, P.; ANJAY, K. S.; DAYAL, S.; KUMAR, S. Antimicrobial resistance and molecular characterization of *E. coli* from poultry in eastern India. **Vet. Ital**. 2018; 54(3):197-204.
- KEANE, W. F.; WELCH, R.; GEKKER, G.; PETERSON, P. K. Mechanism of *Escherichia coli* alpha-hemolysin-induced injury to isolated renal tubular cells. **Am. J. Pathol**. 1987. 126:350–357.
- KEERATIPIBUL, S.; MEETHONG, S.; TECHARUWICHIT, P.; THEPHUTTEE, N. Prevalence of *Escherichia coli* and enterococci in a Thai frozen cooked chicken plant, and modeling of the cleaning and sanitizing procedure. **Food Control**, v 21, 8, 2010. p 1104-1112.
- KEERATIPIBUL, S.; OUPAICHIT, T.; TECHARUWICHIT, P. Contamination profiles of *Escherichia coli* and enterococci in steamed chicken meat products. **Journal of Food Protection**, 72. 2009, pp. 1821-1829
- KENNEDY, C.A.; FANNING, S.; KARCZMARCZYK, M.; BYRNE, B.; MONAGHAN, Á.; BOLTON, D.; SWEENEY, T; Characterizing the Multidrug Resistance of non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Cattle Farms and Abattoirs. **Microbial Drug Resistance**, 2017. 23(6), 781–790.



- KEYES, K.; HUDSON, C.; MAURER, J.J.; THAYER, S.; WHITE D.G.; LEE, M.D. Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2000.44:421–424.
- KIM, Y. B.; YOON, M. Y.; HÁ, J. S.; SEO, K. W.; NOH, E. B.; SON, S. H.; LEE, Y. J. Molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* from broiler chickens with colibacillosis. **Poult Sci.** 2020, 99(2): 1088-1095.
- KORB, A.; NAZARENO, E.R.; COSTA, L.D.; NOGUEIRA, K. S.; DALSENTER, P. R.; TUON, F. F. B.; POMBA, M. C. Tipagem molecular e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* de frangos de corte e de tratadores na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** 2015. 35(3): 258-264.
- LINDSEY, R. L.; POUSEELE, H.; CHEN, J. C.; STROCKBINE, N. A.; CARLETON, H. A. Implementation of whole genome sequencing (WGS) for identification and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in the United States. **Front Microbiol** 2016.7:766.
- LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T.R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L. F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LUCHAO L.V.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, JH.; SHEN, J. Emergence of plasmidmediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infect Dis.** 2015. pii: S1473-3099(15)00424-7.
- LOIKO, M. R.; DE PAULA, C. M.; LANGONE, A. C.; RODRIGUES, R. Q.; CIBULSKI, S.; RODRIGUES, R.; CAMARGO, A. C.; NERO, L. A.; MAYER, F. Q.; TONDO, E. C. Genotypic and antimicrobial characterization of pathogenic bacteria at different stages of cattle slaughtering in southern Brazil. **Meat science,** 2016. 116, 193–200.
- LUJÁN, D. A.; LUJÁN, L. M.; MAMANI, E. Resistência a Antibióticos de Cepas *Escherichia coli* Isoladas de Infecções do Trato Urinário Adquiridas na Comunidade – Cidade de Lima, Peru. **Cient. Ciênc. Biol. Saúde.** 2012.V.20, n.17..
- MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBART S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, **Clin. Microbiol. Infect.** 18. 2012. 268–81.
- MALUTA, R. P.; LEITE, J. L.; ROJAS, T. C. G.; SCALETSKY, I. C. A.; GUASTALLI, E. A. L.; RAMOS, M. C.; SILVEIRA, W. D. Variants of ast A gene among extra-intestinal *Escherichia coli* of human and avian origin. **FEMS Microbiology Letters,** 2017. 364, 6. fnw285.
- MANAGE, D. P.; LAUZON, J.; JONES, C. M.; WARD, P. J.; PILARSKI, L. M.; PILARSKI, P. M.; MCMULLEN, L. M. Detection of pathogenic *Escherichia coli* on potentially contaminated beef carcasses using cassette PCR and conventional PCR. **BMC microbiology,** 2019. 19(1), 175.
- MANIE, T.; KHAN, S.; BROZEL, V.S.; VEITH, W.J.; GOUW, P.A. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South America. **Lett. Appl. Microbiol.,** v.26, 1998. p.253–258.

MARTINEZ-VAZQUEZ, A. V.; RIVERA-SANCHEZ, G.; LIRA-MENDEZ, K.; REYES-LOPEZ, M. A.; BOCANEGRA-GARCIA V. Prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from retail meat in Tamaulipas, Mexico. **J Glob Antimicrob Resist**, 14. 2018, pp. 266-272.

MAYNARD, C.; FAIRBROTHER, J. M.; BEKAL, S.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R. C.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L.; LARIVIÈRE, S.; HAREL, J. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. **Antimicrob. Agents Chemother**. 2003, 47, 3214–3221.

MBELLE, N. M.; FELDMAN, C.; SEKYERE, J. O.; MANINGI, N. E.; MODIPANE, L.; ESSACK, S. Y. The resistome, mobilome, virulome and phylogenomics of multidrug-resistant *Escherichia coli* clinical isolates from Pretoria, South Africa. **Sci. Rep.** 2019; 9:16457.

MINARINI, L. A.; DARINI, A. L. Mutations in the quinolone resistance determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. **Braz J Microbiol**. 2012; 43:1309–1314.

MINHARRO, S.; LINHARES, G.F.C.; ANDRADE, M.A.; ROCHA P.T.; SANTANA A.P. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. **Ciênc. Anim. Bras.** 2001. 2:111-117.

MINH, S.H.; KIMURA, E.; MINH, D. H.; HONJOH, K.; MIYAMOTO, T. Virulence characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw meats and clinical samples **Microbiol Immunol**, 59. 2015, pp. 114-122.

MONAGHAN, Á.; BYRNE, B.; FANNING, S.; SWEENEY, T.; MCDOWELL, D.; BOLTON, D. J. Serotypes and virulotypes of non-O157 shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) on bovine hides and carcasses. **Food Microbiology**, 2012. 32(2), 223–229.

MONTSO, P.K.; MLAMBO, V.; ATEBA, C.N. The first isolation and molecular characterization of shiga toxin-producing virulent multi-drug resistant atypical enteropathogenic *E. coli* O177 serogroup from South African cattle. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, 2019. 9: 333

MORAIS, L. C. S.; FREITAS FILHO, E. G.; FERREIRA, M. R. A.; PINTO, J. F. N.; MOREIRA, A. N.; MOREIRA, C. N. Prevalência de *Escherichia coli* produtoras de shigas toxina (STEC) em propriedades leiteiras no sudoeste goiano no período seco. *Vet. e Zootec.* 2011 dez.; 18(4 Supl. 3): IX Congresso Brasileiro Buiatria. 04 a 07 de Outubro de 2011. Goiânia - Go, Brasil. 693.

NASCIMENTO, K. A.; BORGES, G. A.; PRADO, L. G.; FERREIRA, M. R. A.; ARANTES, T. Q.; PINTO, J. F. N.; MOREIRA, C. N. Caracterização molecular de *Escherichia coli* verotoxigênicas em amostras de carne bovina e queijo tipo frescal. I Encontro Acadêmico do Campus Jataí – UFG. 2013. Acessado em: 25 de agosto de 2020. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/305387899\\_CHARACTERIZACAO\\_MOLECULAR\\_DE\\_Escherichia\\_coli\\_VEROTOXIGENICAS\\_EM\\_AMOSTRAS\\_DE\\_CARNE\\_BOVINA\\_E\\_QUEIJO\\_TIPO\\_FRESCAL](https://www.researchgate.net/publication/305387899_CHARACTERIZACAO_MOLECULAR_DE_Escherichia_coli_VEROTOXIGENICAS_EM_AMOSTRAS_DE_CARNE_BOVINA_E_QUEIJO_TIPO_FRESCAL)

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

NESPOLO, N. M.; SABA, R. Z.; ROSSATELLI, D. A.; FAIRBROTHER, J. M.; ROSSI JÚNIOR, O.D. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 e O26 sorbitol negativas em matadouro frigorífico de bovino e suscetibilidade a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, 2014. 3(81): 209-217.

OJDANA D, SIENKO A, SACHA, P.; MAJEWSKI, P.; WIECZOREK, P.; WIECZOREK, A.; TRYNISZEWSKA, E. Genetic basis of enzymatic resistance of *E. coli* to aminoglycosides. **Adv Med Sci** 2017;63:9–13.

OLIVEIRA, M.; BRITO, J.; GOMES, T.; GUTH, B.; VIEIRA, M.; NAVES, Z.; VAZ, T. M. I; IRINO, K. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, 127(1-2), 2008. 139–146.

OTEO, J., DIESTRA, K., JUAN, C., BAUTISTA, V., NOVAIS, A., PÉREZ-VÁZQUEZ, M., Moyá B.; MIRÓ, E.; COQUE, T. M.; OLIVER, A.; CANTÓND, R.; NAVARRO, F.; CAMPOS, J. Extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. **Int J Antimicrob Agents**. 2009. 34: 173–176.

PADUA, Gracielle Teles. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) multirresistente em carcaças de bovinos. 2018. 21 f., il. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal). Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2018.

PAIVA, M. C.; NASCIMENTO, A. M. A.; CAMARGO, I. L. B. C.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; NARDI, R. M. D). The first report of the qnrB19, qnrS1 and aac(6')-Ib-cr genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 107(5), 2012. 687–689.

PALMEIRA, J. D.; HAENNI, M.; METAYER, V.; MADEC, J.-Y.; FERREIRA, H. M. N. Epidemic spread of Inc11/pST113 plasmid carrying the Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) blaCTX-M-8 gene in *Escherichia coli* of Brazilian cattle. **Veterinary Microbiology**, 2020. 43. 2108629.

PARVEJ, M. S.; MAMUN, M.; HASSAN, J.; MAHMUD, M. M.; RAHMAN, M.; TANVIR, M.; RAHMAN, M.; RAHMAN, B.; NAZIR, K. N. H. Prevalence and characteristics of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from beef slaughterhouse. **J. Adv. Vet. Anim. Re**, v. 5, n. 2, 2018.p. 218-225.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. **J. Clin. Microbiol.** 1998. 36:598–602.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Direct Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA and saa. **Journal of clinical microbiology**, 2002. 271-274.

PESSANHA, R. P.; FILHO, P. P. G. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de *Enterobacteriaceae* lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, 2001.v.53 n.1.

RAFIQUE, M.; POTTER, R.F.; FERREIRO, A.; WALLACE, M.A.; RAHIM, A.; ALI MALIK, A.; SIDDIQUE, N.; ABBAS, M.A.; D'SOUZA, A.W.; BURNHAM, C.D.; ALI, N.; DANTAS, G.

Genomic Characterization of Antibiotic Resistant *Escherichia coli* Isolated From Domestic Chickens in Pakistan. **Front. Microbiol.** 2020, 10, 3052.

RASHEED, M. U.; JAMIL, K.; THAJUDDIN, N.; PASUPULETI, M.; AHAMED, P.; MUTHUKUMARESAN, K. P. Distribution of the *stx 1*, *stx 2* and *hlyA* genes: antibiotic profiling in shiga-toxigenic *E. coli* strains isolated from food sources. **Int J Curr Microbiol App Sci** 2014;3:348–61.

RIGOBELLO, E. C.; SANTO, E.; MARIN, J. M. Beef Carcass Contamination by Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Strains in an Abattoir in Brazil: Characterization and Resistance to Antimicrobial Drugs. **Foodborne Pathogens and Disease**, 5(6), 2008. 811–817.

RIVERA-BETANCOURT, M.; SHACKELFORD, S. D.; ARTHUR, T. M.; WESTMORELAND, K. E.; BELLINGER, G.; ROSSMAN, M.; REAGAN, J. O.; KOOHMARAIE, M. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. **Journal of food protection**, 2004. 67(2), 295–302

RODRIGUES, A. C. A; PINTO, P. S. A; VANETTI, M. C. D.; BEVILACQUA, P. D.; PINTO, M. S.; NERO, L.A. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. **Cienc. Rural**, 38 (7), 2008. 1948-1953.

RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L.R.; TAGLIARI, V.Z.; RIZZO, N.N.; TRENHAGO, G.; OLIVEIRA, A. P.; GOETZ, F.; NASCIMENTO, V.P. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from poultry slaughterhouse. **Braz. J. Microbiol.** 2010. 41: 1082–1085.

RODRIGUEZ-VILLODRES, A.; BONNIN, R. A.; ROSA, J. M. O.; ALVAREZ-MARIN, R.; NAAS, T.; AZNAR, J.; PACHÓN, J.; LEPE, J. A.; SMANI, W. Phylogeny, Resistome, and Virulome of *Escherichia coli* Causing Biliary Tract Infections. **J Clin Med.** 2019;8(12).

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

SAMBA-LOUAKA, A.; NOUGAYREDE, J.P.; WATRIN, C.; OSWALD, E.; TAIEB, F. The enteropathogenic *Escherichia coli* effector *Cif* induces delayed apoptosis in epithelial cells. **Infect Immun.** 2009. 77: 5471–5477.

SANTOS, R. L. Pesquisa de indicadores de biofilmes de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em abatedouros frigoríficos de bovinos e aves localizados no DF, Entorno e Goiás. 2018. Trabalho de conclusão de curso (Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAV, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

SANTOS, E.; CASTRO, V. S.; CUNHA-NETO, A.; SANTOS, L.; VALLIM, D. C.; LISBÔA, R. C.; CARVALHO, R.; JUNIOR, C.; FIGUEIREDO, E. *Escherichia coli* O26 and O113:H21 on Carcasses and Beef from a Slaughterhouse Located in Mato Grosso, Brazil. **Foodborne pathogens and disease**, 15(10), (2018). 653–659.

SANTOS, R. L.; PALMA, J. M.; SANTANA, A. P. Avaliação da qualidade higiênico sanitária de carcaças de bovinos oriundos de abatedouros frigoríficos do Distrito Federal e Entorno. **Higiene Alimentar**, v. 31, 2017. p. 80-83.

- SCHWARTZ, T.; KOHNEN, W.; HANSEN, B.; OBST, U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS Microbiol. Ecol.** 2003, 43, 325–335.
- SETHULEKSHMI, C.; LATHA, C.; ANU, C. J. Occurrence and quantification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food matrices, **Veterinary World**, 2018. 11(2): 104-111.
- SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends Food Sci Tech.** 2009. 20: 407–413.
- SILVA, I. M. M.; NETO, E. J.; SILVA, R. M.; SILVA, N. L.; MAGALHÃES, J.; BALIZA, M. Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, 2011. p.333-339.
- SIQUEIRA, R.S. Manual de microbiologia de alimentos. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa e Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Rio de Janeiro, 1995.
- SOARES, V. M.; VIANA, C.; PEREIRA, J. G.; DESTRO, M. T.; NERO, L. A.; BERSOT, L. S.; PINTO, J. P. A. N. Absence of a continuous water spray system does not influence the microbiological contamination of the conveyor belts in chicken slaughterhouses. **LWT.** Volume 97, November 2018, Pages 414-418.
- SPINOSA, H. S.; TÁRRAGA, K. M. Considerações Gerais sobre os Antimicrobianos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 441-450.
- STENUTZ, R.; WEINTRAUB, A.; WIDMALM, G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. **FEMS Microbiol Rev.**, 2006. 382-403.
- SURAK, J. G. (2002). The certified quality auditor's HACCP handbook. Wilwaukee: American Society for Quality.
- STELLA, A. E.; VITOR, T. L.; GADELHA D. F. B. G.; MOREIRA, C.N.; BARTOLI, R. B. M.; OLIVEIRA, A. F. *Escherichia coli* resistente a antimicrobianos isolada de bovinos e aves. **Ars. Vet.** 2013. 29:14.
- STOCCO, C. W. Controle de qualidade microbiológico em frigorífico. 2017. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2017.
- STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A. Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, 2000. p. 175-179.
- STROMBERG, Z. R.; REDWEIK, G. A. J.; MELLATA, M. Detection, prevalence, and pathogenicity of Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle hides and carcasses. **Foodborne Pathogens and Disease**, 15(3), 2018. 119–131.
- TANIH, N.F.; SEKWADI, E.; NDIP, R.N.; BESSONG, P.O. Detection of pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from cattle and pigs slaughtered in abattoirs in Vhembe District, South Africa. **Sci. World J.** 2015. Volume 2015, Article ID 195972, 8 p.

TIBA, M.R.; NOGUEIRA, G.R.; LEITE, D.S. Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com cistite. **Rev Soc Brasil Med Trop.** 2009. 42(1), 58 -62.

TIMM, C. D.; CONCEIÇÃO, F. R.; MENIN, A.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. G. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in southern Brazil isolated from ground beef and raw milk. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, 2009. p.641-649.

TOMPKIN, R. B. HACCP in the meat and poultry industry. **Food Control**, 5, 1994. 153–161.

TORO, M.; RIVERA, D.; JIMENEZ, M. F.; DÍAZ, L.; NAVARRETE, P.; REYES-JARA, A. Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from retail ground beef in Santiago, **Chile Food Microbiology**, 75. 2018, pp. 55-60.

TSOLA, E.; DROSINOS, E. H.; ZOIPOULOS, P. Impact of poultry slaughter house modernisation and updating of food safety management systems on the microbiological quality and safety of products. **Food Control**, 19, 2008. 423-431.

TUTENEL, A. V.; PIERARD, D.; VAN HOOFF, J.; ZUTTER, L. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157 contamination routes in a cattle slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, 66(9), 2003. 1564–1569.

VAN DEN BOGAARD, A. E.; LONDON, N.; DRIESSEN, C.; STOBBERINGH, E.E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. **J Antimicrob Chemother.** 2001; 47(6): 763–71.

VAN, T. T. H.; CHIN, J.; CHAPMAN, T.; TRAN, L.T.; COLOE, P.J. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. **Int J Food Microbiol.** 2008;124(3):217-223.

VOGELEER, P.; TREMBLAY, Y. D.; MAFU, A. A.; JACQUES, M.; HAREL J. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **Front Microbiol.** 2014. 5:317

VON LAER, Ana Eucares. Caracterização de *Escherichia coli* produtoras de toxina de shiga (STEC) isoladas na produção de bovinos de corte e nas respectivas carcaças dos animais abatidos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2008.

VIANA, C. Uso de aspersão de água sobre a contaminação superficial de esteiras sanitárias condutoras de cortes de frango em frigoríficos de aves. 2014. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Microbiologia Aplicada à Produção. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014

VIEIRA, Y. C.; MARQUES, A. D. S. S.; POLL, P. S. E. M.; SANTANA, A. P.; MURATA, L. S.; Perecmanis, S. Detection of enterotoxin and adhesin genes of *Escherichia coli* strains isolated from feces of healthy dogs. **Acta Veterinaria Brasilica.** v. 14 n. 1. 2020.p. 16-20.

XAVIER, B. B.; LAMMENS, C.; RUHAL, R.; KUMAR-SINGH, S.; BUTAYE, P.; GOOSSENS, H.; MALHOTRA-KUMAR, S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **Euro Surveill.** 2016;21(27):pii=30280.

XIA, X.; MENG, J.; MCDERMOTT, P.F.; AYERS, S.; BLICKENSTAFF, K.; TRAN, T. T.; ABBOTT, J.; ZHENG, J.; ZHAO, S. Presence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. **Appl. Environ. Microbiol.** 2010. 76(6): 1709-1717.

WANG, G.; CLARK, C. G.; RODGERS, F. G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, 2002.p. 3613-3619.

WHO. World Health Organization. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, 2015. Disponível em: < <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/> >. Acesso em: 30 Julho 2020.

WOOD, M. J. The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin. **J Antimicrob Chemother** 1996;37:209–22.

WU, S.; DALSGAARD, A.; HAMMERUM, A. M.; PORSBO, L. J.; JENSEN, L. B. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. **Acta Vet. Scand.** 2010. 52:47.

YIN, W.; LI, H.; SHEN, Y.; LIU, Z.; WANG, S.; SHEN, Z.; ZHANG, R.; WALSH, T.R.; SHEN, J.; WANG, Y. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. **mBio** 2017. 8:e00543-17.

YOON, M. Y.; LEE, Y. J. Molecular characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli* serotype O78 in Korea. **J. Prev. Vet. Med.** 2020, 44(1): 40-43.

ZACHARY, R.; REDWEIK G. A. J.; MELLATA, M. Detection, Prevalence, and Pathogenicity of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Cattle Hides and Carcasses. **Foodborne pathogens and disease**, 2018. v. 15(3):119-131.

ZHANG, S.; YANG, G.; HUANG, Y.; ZHANG, J.; CUI, L.; WU, Q. Prevalence and Characterization of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Retail Foods in China. **Journal of Food Protection**, 2018. 81(11), 1761–1767.