



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Escherichia coli* ISOLADAS  
DE SUÍNOS ABATIDOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**ANDRÉ DE SOUZA SANTOS**

**Recife, 2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Escherichia coli* ISOLADAS  
DE SUÍNOS ABATIDOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**ANDRÉ DE SOUZA SANTOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Co-orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior

**Recife, 2014**

### **Ficha Catalográfica**

**S237C Santos, André de Souza**

**Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* isoladas de suínos abatidos no estado de Pernambuco, Brasil / André de Souza Santos. -- Recife, 2014.**

**95 f.: il.**

**Orientador (a): Rinaldo Aparecido Mota.**

**Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.**

**Inclui anexo(s), apêndice(s) e referências.**

**1. *Escherichia coli* 2. Multirresistência 3. Biofilme 4.**

**Plasmídeo**

**5. Filogenia 6. Virulência I. Mota, Rinaldo Aparecido, orientador**

**II. Título**

**CDD 591.4**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Escherichia coli* ISOLADAS  
DE SUÍNOS ABATIDOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação de Mestrado elaborada por

**ANDRÉ DE SOUZA SANTOS**

Local da defesa: Auditório da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / UFRPE

Aprovada em 21 / 02 / 2014

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota – Orientador**

Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior – Co-orientador**

Unidade Acadêmica de Garanhuns / UFRPE

---

**Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa**

Universidade Federal do Vale do São Francisco

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mercia Rodrigues Barros**

Universidade Federal Rural de Pernambuco

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Manoel José dos Santos e Maria José de Souza (Zezê), por terem me encorajado a buscar os meus sonhos, demonstrando sempre o amor e afeto que têm por mim e que é recíproco. Espero, um dia, poder retribuir por tudo o que me proporcionaram.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu saúde e discernimento para fazer as melhores escolhas, sempre no caminho certo, e me afastando de tudo aquilo que poderia interromper a minha caminhada.

Aos meus pais, Manoel José dos Santos e Maria José de Souza, que sempre me incentivaram, incondicionalmente. Que fizeram do meu sonho, também, o sonho deles. Mesmo longe de casa e, muitas vezes, ausente, vocês sempre estiveram e estarão no meu coração.

Aos meus avós, Maria Rosa, José Dionísio (*in memoriam*), Maria Rainha (*in memoriam*) e José Miguel (*in memoriam*), que formaram e educaram esta grande família que me acolhe.

Aos meus irmãos, Josenildo, Thiago e José Paulo, pela fraternidade em todos os momentos. E a todos os entes queridos, que mesmo à distância me deram apoio emocional e vibrarão com mais esta vitória.

À Débora P. Batista, pela compreensão, companheirismo, respeito, por ter me feito sorrir diante das dificuldades, tornando mais fácil a transposição de vários obstáculos e por ter feito da sua família, também a minha família, diminuindo a saudade daqueles que estavam distantes.

Aos membros do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da UFRPE e amigos, André Mota, José Givanildo, Renata Pimentel, Luana Rapôso, Áurea Azevêdo, Carlos Adriano, Maina Almeida, Pomy Kim, Fernando Kim, Atzel Acosta, Elise Yamazaki, Renata Cezar, Sandra Santos, Erika Samico, Marcela Samico, Bruno Alves, Mauro Bezerra, Débora Rochelly, Érica Moraes, Marcus Amorim e demais estagiários e pós-graduandos, pela presença, ajuda mútua e de prontidão, conversas e confraternizações, tornando o ambiente de trabalho descontraído, mas com seriedade e responsabilidade.

Aos amigos Débora Viegas (Pen), Pedro Paulo (PP) e Orestes Luiz (Souza Neto et al.), pela parceria, torcida, amizade acima de tudo, companheiro em toda e qualquer situação. Contem sempre com a minha amizade.

Ao Prof. Rinaldo Aparecido Mota, que mais uma vez depositou confiança em mim e aceitou ser meu orientador. Obrigado pelos ensinamentos.

Aos Profs. Leonildo Bento Galiza da Silva, Andrea Alice da Fonseca Oliveira e José Wilton Pinheiro Júnior, pelas colaborações no dia-a-dia no laboratório e contribuições com este trabalho.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF – Petrolina que me acolheram e contribuíram para a execução de parte deste trabalho, especialmente ao Prof. Mateus Matiuzzi da Costa, Gisele Veneroni Gouveia e Maria da Conceição Aquino de Sá.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro concedido, que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) por ter, gentilmente, cedido as cepas de controle positivo para as reações de PCR.

A todos os não mencionados aqui, mas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## **FONTES FINANCIADORAS**

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) - Processos N°s: IBPG-0400-5.05/11 e AMD-0026-5.05/13.

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical (PPGCAT).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



## RESUMO

Objetivou-se neste estudo analisar filogeneticamente, detectar a presença de genes de virulência e de plasmídeos, determinar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos e verificar a produção de biofilme em cepas de *Escherichia coli* isoladas de suínos hígidos abatidos no estado de Pernambuco, Brasil. A partir do cultivo de conteúdo intestinal coletado na linha de abate, isolados bacterianos foram submetidos a provas bioquímicas, sendo 126 confirmados como *Escherichia coli*, as quais posteriormente foram analisadas genotípica e fenotipicamente, pelos métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese, teste de aderência em microplacas e disco difusão em ágar. O grupo filogenético mais frequente foi o B1, com 88,10% (111/126) dos isolados, seguido pelos grupos D com 4,76% (6/126), B2 com 3,97% (5/126) e A com 3,17% (4/126) dos isolados. O gene 987P (F6), presente em 96,72% (118/122) dos isolados que apresentaram algum gene de virulência, foi o mais frequente, seguido dos genes BFP em 90,98% (111/122), K88 (F4) em 18,85% (23/122) e STb em 2,46% (3/122) dos isolados positivos para genes de virulência. Os genes LT, STa, STX2e, K99 (F5) e F18 não foram detectados em nenhum dos isolados. Dos isolados testados, 46,03% (58/126) apresentaram conteúdo plasmidial e na avaliação da resistência aos antimicrobianos, todos os isolados foram resistentes à eritromicina e lincomicina, enquanto que o cloranfenicol foi a droga de maior eficiência *in vitro*. O índice de resistência múltipla (IRMA) variou de 0,2 a 0,9, determinando multirresistência em 99,21% (125/126) dos isolados. A capacidade de produzir biofilme foi detectada em 46,03% (58/126) dos isolados. Este foi o primeiro estudo desta natureza no estado de Pernambuco. Embora os isolados analisados no presente estudo sejam provenientes de animais hígidos e a maioria deles tenha sido considerada comensal, a presença de genes de virulência, bem como os elevados índices de resistência múltipla aos antimicrobianos alertam sobre os riscos da transmissão de bactérias com este perfil entre animais e humanos, reforçando a necessidade de mais estudos que incentivem a adoção de manejos sanitários adequados nos rebanhos e que apresentem alternativas no controle destes micro-organismos.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, multirresistência, biofilme, plasmídeo, filogenia, virulência

## ABSTRACT

Aimed with the present study to analyze phylogenetically, detect the presence of virulence genes and plasmids, determine the antimicrobial susceptibility profile, and verify biofilm production in *Escherichia coli* strains isolated from healthy pigs slaughtered in Pernambuco state, Brazil. Bacteria isolated from intestinal content were subjected to biochemical tests. 126 strains were confirmed as *Escherichia coli*, which were subsequently analyzed by genotypic and phenotypic methods like polymerase chain reaction (PCR), electrophoresis, disk diffusion, and adhesion microplates test. The most common phylogenetic group was B1 with 88.10% (111/126) of the strains, followed by 4.76% in group D (6/126), 3.97% (5/126) in group B2, and 3.17% (4/126) in group A. 987P (F6) gene was the most common, found in 96.72 % (118/122) of strains that showed some virulence gene, and followed by BFP in 90.98% (111/122), K88 (F4) in 18.85% (23/122), and STb in 2.46% (3/122). LT, STa, STX2e, K99 (F5), and F18 genes were not detected in any of the strains. 46.03% (58/126) of the tested strains had plasmidial content, and in resistance evaluation test to antimicrobial drugs, all isolates were resistant to erythromycin and lincomycin, while chloramphenicol was the most efficient antibacterial drug *in vitro*. Multiple resistance index ranged from 0.2 to 0.9, determining multidrug resistance in 99.21% (125/126) of the strains. The ability to produce biofilm was detected in 46.03% (58/126) of the strains. This study was the first of its kind in Pernambuco state. Although the strains analyzed in this study come from healthy animals and most of them have been considered commensal, the presence of virulence genes, as well as high levels of multiple antimicrobial resistance warn about the risks of transmission of bacteria with this profile between livestock and human populations, reinforcing the need for more studies that encourage the adoption of appropriate health managements in herds and presenting alternatives to control these micro-organisms.

**Keywords:** *Escherichia coli*, multidrug resistance, biofilm, plasmid, phylogeny, virulence

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1. Enterite nos suínos.....	18
2.2. <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.3. <i>Escherichia coli</i> e toxinas .....	20
2.3.1. Enterotoxinas Termoestáveis (ST) .....	21
2.3.2. Enterotoxinas Termolábeis (LT) .....	22
2.3.3. Outras enterotoxinas comuns em <i>Escherichia coli</i> isoladas em diarreia de suínos.....	23
2.4. Colibacilose.....	23
2.5. Vacinas.....	25
2.6. Resistência a antimicrobianos.....	27
2.7. Produção de biofilme.....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	32
3.1. Geral.....	32
3.2. Específicos.....	32
<b>3. REFERÊNCIAS</b> .....	33
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	42
Análise filogenética, produção de biofilme e perfil de resistência antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> isoladas de suínos abatidos no estado de Pernambuco.....	42
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	58
Detecção de plasmídeos, genes de virulência e classificação filogenética de <i>Escherichia coli</i> isoladas de suínos abatidos no estado de Pernambuco, Brasil.....	58
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	70
<b>APÊNDICE</b> .....	71
APÊNDICE A – Isolados de <i>Escherichia coli</i> de intestino delgado de suínos hígidos utilizados na caracterização fenotípica e genotípica.....	72
<b>ANEXOS</b> .....	75
ANEXO A – Normas para submissão ao periódico <i>Brazilian Journal of Microbiology</i> .....	76
ANEXO B – Normas para submissão ao periódico <i>Transboundary and Emerging Diseases</i> .....	84
ANEXO C – Parecer de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE.....	95

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1.** Representação esquemática das etapas de desenvolvimento de biofilmes..... 30

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>Tabela 1.</b> Sequências dos <i>primers</i> e tamanhos dos amplicons em pares de bases (pb) observados na PCR para estudo filogenético.....	46
--	----

### Capítulo 2

<b>Tabela 2.</b> Sequências dos <i>primers</i> e tamanhos dos amplicons em pares de bases (pb) observados na PCR para estudo de fatores de virulência.....	62
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BFP	Pili formadora de vesícula ( <i>Bundle forming pillus</i> )
Ca	Íon cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFTR	Regulador transmembrana da fibrose cística
Cl	Íon cloro
CNF	Fator citotóxico necrosante ( <i>Cytotoxic necrotizing factor</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Mistura de nucleotídeos (A, C, G e T)
DO	Densidade óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST	Toxina termoestável enteroagregativa
eDNA	Ácido desoxirribonucleico extracelular
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EPS	Exopolissacarídeos
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América
F1	Antígeno fimbrial
F107	Antígeno fimbrial
F18	Antígeno fimbrial
F4	Antígeno fimbrial do tipo K88
F41	Antígeno fimbrial
F5	Antígeno fimbrial do tipo K99
F6	Antígeno fimbrial do tipo 987P
FP	Antígeno fimbrial do tipo operon <i>pap</i>
GMPC	Guanosina monofosfato cíclica
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IRMA	Índice de resistência múltipla a antimicrobianos

LT	Enterotoxina termolábil
Min	Minuto
Na	Íon Sódio
PB	Pares de bases
pH	Potencial de hidrogênio
PRRS	Síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos
S	Segundo
STa e STb	Enterotoxinas termoestáveis do tipo A e B
STEC ou VETEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de shiga toxina
STx2e	Shiga toxina tipo 2e
Taq DNA pol	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior
≤	Menor ou igual
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
pmol	Picomol
U	Unidade



## 1. INTRODUÇÃO

A suinocultura é considerada um importante fator de geração de renda em países desenvolvidos, constituindo-se em um dos ramos mais valiosos da pecuária, uma vez que a criação de suínos pode ser desenvolvida tanto em grandes como em pequenas propriedades. Além disso, os suínos são animais que podem ser explorados com pouco capital inicial, são altamente prolíferos, possuem uma elevada taxa de conversão alimentar, produzem carne de excelente qualidade e os lucros com a produção podem ser observados ainda no primeiro ano da atividade, levando vantagem em relação à maioria dos outros animais domésticos (TIBÚRCIO, 2012).

Estima-se que atualmente o rebanho suíno mundial seja de aproximadamente 970 milhões de cabeças, com produção anual de mais de 105 milhões de toneladas de carne. Esta carne é a mais consumida no mundo, representando mais de 40% de toda a carne consumida mundialmente e ficando à frente das carnes bovina e de frango (ABIPECS, 2013; FAO, 2013).

O Brasil possui o quarto maior rebanho suíno do mundo com cerca de 40 milhões de cabeças, ficando atrás de China, União Europeia e Estados Unidos da América, que possuem rebanhos de 471, 150 e 67 milhões de cabeças, respectivamente (FAO, 2013).

Em 2012, a produção brasileira de carne suína atingiu a marca de 3,3 milhões de toneladas, das quais 581.477 foram exportadas, movimentando U\$1,49 bilhão, o que resultou num crescimento de 12,60% em volume e 4,21% em valor de exportação quando comparado ao ano de 2011. Este fato demonstra a importância da suinocultura brasileira no cenário mundial e confirma as expectativas de aumento da produção neste ramo da pecuária (ABIPECS, 2013).

Na região Nordeste, o rebanho suíno em 2010 ultrapassou a marca das 6 milhões de cabeças, ficando atrás das regiões Sul e Sudeste, que registraram rebanhos de 18,6 e 7,1 milhões de cabeças, respectivamente, e são historicamente as regiões com maior produção suína no Brasil (IBGE, 2010).

O estado de Pernambuco vem aumentando sua produção suína nos últimos anos, alcançando em 2010 um plantel de 421 mil cabeças, um aumento considerável se comparado as 278 mil cabeças registradas em 2006, com grande importância principalmente nas regiões da zona da mata e agreste (LIMA et al., 2006; IBGE, 2010).

Entretanto, para atingir tais índices de produtividade, a suinocultura brasileira passou por diversas modificações tecnológicas, intensificando a produção e melhorando a genética dos reprodutores. E como consequência de tal intensificação, a ocorrência de situações de estresse dos animais é constante, fato que pode favorecer o surgimento de diferentes enfermidades, principalmente distúrbios respiratórios e enterites (CALDERARO et al., 2001).

Neste contexto, as enterites bacterianas têm apresentado crescente importância, sendo observadas frequentemente em diferentes faixas etárias, o que têm causado grande impacto na cadeia produtiva de suínos em todo o mundo (JACOBSON et al., 2005) e gerado perdas econômicas em torno de 30% na suinocultura moderna (BURCH, 2000) devido às altas taxas de morbidade e mortalidade, além das sequelas no trato gastrointestinal e gastos com antibioticoterapia (STRAW et al., 1999; JACOBSON et al., 2005). Além disso, alguns dos agentes etiológicos envolvidos apresentam potencial patogênico para os humanos, representando um risco à saúde pública (MENIN et al., 2008).

A Colibacilose é uma das principais enterites bacterianas em leitões neonatos e pós-desmame e tem como agente etiológico cepas toxigênicas de *E. coli*, bactéria que é amplamente encontrada no meio ambiente, colonizando diferentes hospedeiros (QUINN et al., 2005; KOLLING, 2009).

Os crescentes desempenhos da suinocultura no estado de Pernambuco, além da constante demanda por alimentos de qualidade, vêm exigindo uma melhora considerável nos parâmetros sanitários dos rebanhos, visando maiores índices produtivos e menores riscos à saúde humana. Dessa forma, a realização de estudos que buscam caracterizar os microorganismos envolvidos na colibacilose suína, além do perfil de resistência aos antimicrobianos, é de grande relevância para a orientação de técnicos e produtores quanto às medidas de controle e prevenção, bem como no uso racional dos antimicrobianos, o que reflete diretamente na cadeia produtiva dos suínos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Enterites nos suínos

Boa conversão alimentar e adequado ganho de peso diário são fatores determinantes para que leitões e animais em fase de terminação tenham um bom crescimento. Estes animais devem chegar ao abate em tempo programado e com peso que satisfaça as exigências do mercado, além de ter boa qualidade de carcaça e uniformidade entre animais de um mesmo lote. Sendo assim, parâmetros como, ganho de peso dos animais, uniformidade do rebanho, ocorrência de doenças e taxa de mortalidade dão uma visão geral da eficiência produtiva desta fase (ALMEIDA, 2008).

Dentre as doenças que acometem o rebanho suíno, as infecções entéricas são responsáveis por sensíveis perdas nos índices zootécnicos do plantel, especialmente quando ocorrem em animais neonatos e pós-desmame (ALMEIDA et al., 2009), podendo levar a altas taxas de morbidade e mortalidade em qualquer faixa etária (STRAW et al., 1999).

Os prejuízos causados por essas enterites são decorrentes da redução da eficiência alimentar e do expressivo atraso no crescimento dos animais em virtude de possíveis sequelas no trato gastrointestinal, que podem ser transitórias ou permanentes. Além disso, estes distúrbios entéricos provocam aumento dos gastos com alimentação suplementar e com medicamentos, respondendo por cerca de 60% dos gastos com antimicrobianos na suinocultura moderna (STRAW et al., 1999; PEARCE, 1999; JACOBSON et al., 2005).

Os agentes etiológicos mais frequentemente envolvidos nas enterites dos suínos são: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira pilosicoli*, *Clostridium perfringens* tipo C ou A, coronavírus, rotavírus e *Isospora suis*, podendo haver infecção por apenas um agente etiológico, ou por uma interação de múltiplos agentes (CALDERARO et al., 2001; CARPENTER & BURLATSCHENKO, 2005). Entretanto, outros agentes de menor importância já foram descritos como causadores de diarreia neonatal em suínos como o calicivírus (GUO et al, 2001), picobirnavírus (TREVISOL & ROEHE, 1993), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS) (YAEGER et al., 2002), *Strongyloides ransomi* (NISHI et al., 2000) e *Enterococcus durans* (YAEGER et al., 2002).

## 2.2. *Escherichia coli*

Esta bactéria foi descrita pelo pediatra alemão Theodore Escherich, em 1885, e inicialmente recebeu o nome de *Bacterium coli commune*, sendo posteriormente renomeada para *Escherichia coli* em referência ao pesquisador que a descobriu (ESCHERICH, 1885 apud CHEN & FRANKEL, 2005).

Pertencem à família *Enterobacteriaceae*, caracterizando-se por serem bactérias Gram negativas, bacilares, anaeróbias facultativas, possuidoras de cápsula e flagelos peritríquios. Em meio sólido, as colônias podem ser observadas após 24 horas de incubação a 37°C com aspecto rugoso a mucóide, podendo ser hemolíticas em ágar sangue. Suas características bioquímicas são: ausência da enzima citocromo oxidase, ausência da produção de H<sub>2</sub>S em meios específicos, produção de indol, redução de nitratos, fermentação da lactose, glicose e outros carboidratos com produção de ácido e gás (STROHL et al., 2004; QUINN et al., 2005).

Estas bactérias colonizam diferentes hospedeiros e estão amplamente distribuídas no meio ambiente, sendo comensais do intestino da maioria dos animais, incluindo o homem, desde os primeiros dias de vida até a morte (GUARNER & MELAGELADA, 2003). Cepas desta bactéria podem adquirir fatores de virulência tornando-se hábeis a provocar doenças, sendo denominadas cepas patogênicas, que podem causar infecções intestinais e extraintestinais (NATARO & KAPER, 1998; SHERLEY et al., 2004; MOURA & FERNANDES, 2010). Entretanto, cepas de *E. coli* não patogênicas também podem causar infecção em indivíduos com baixa imunidade (DRASAR & HILL, 1974; MARSCHALL et al., 2012; BARNICH et al., 2013).

A presença de fatores de virulência permite a diferenciação entre cepas patogênicas e comensais. Estes fatores são expressos por genes localizados em ilhas de patogenicidade, sendo responsáveis pela transferência horizontal dos fatores de virulência entre as cepas (SHERLEY et al., 2004; VIEIRA, 2009). Esta transferência pode ocorrer de três formas distintas: por meio de conjugação, onde o contato com outras bactérias vivas possibilita a passagem de genes de virulência presentes em uma molécula de DNA extracromossômica chamada plasmídeo; por meio de um processo chamado transformação, onde a bactéria capta DNA livre no meio ambiente e incorpora ao seu; e por meio de transdução ou conversão lisogênica, onde bacteriófagos transferem genes de virulência para as bactérias (VIEIRA, 2009).

Baseado na presença dos diferentes fatores de virulência pode-se realizar a tipificação das cepas de *E. coli*, utilizando-se métodos sorológicos ou moleculares. A classificação sorológica em sorogrupos e sorotipos é feita pela detecção da sua composição antigênica: antígenos somáticos (O) para os sorogrupos e antígenos flagelares (H) para os sorotipos, além de antígenos capsulares (K) e fimbriais (F), que apresentam grande importância na patogênese (ØRSKOV et al., 1977; BLANCO et al., 1994; BLANCO et al., 2003). Para esta detecção são utilizados antissoros, porém existe apenas uma pequena variedade de antissoros disponível para ser testada comercialmente, o que limita o uso da técnica (HONDA, 2012). Já a patotipificação molecular, leva em consideração a detecção de genes específicos que codificam os variados fatores de virulência, permitindo também a classificação nos diversos patotipos com alta sensibilidade e especificidade, além de rapidez nos resultados (STROHL et al., 2004; TENG et al., 2004).

Os principais fatores de virulência observados em cepas de *E. coli* causadoras de diarreias em suínos são: fímbrias K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F18, F41 e F107 e toxinas LT, STa e STb. Cepas causadoras da doença do edema apresentam a fímbria F18 e a toxina STx2e. Já os isolados envolvidos com infecções urinárias geralmente possuem as fímbrias F1 e FP (operon *pap*) e os fatores de virulência CNF1 e CNF2, além de uma hemolisina codificada pelo gene *hlyA*. Enquanto isso, cepas causadoras de infecções extraintestinais normalmente apresentam o gene *lpaH* que é responsável pela invasão sistêmica de *E. coli* intestinais. A maioria destes fatores de virulência está presente em plasmídeos, o que facilita a sua transmissão entre as diferentes cepas bacterianas, dificultando a classificação precisa nos diferentes patotipos devido à troca de genes entre os isolados (BRITO et al., 2004; TENG et al., 2004).

Diversos patotipos de *E. coli* diarreio gênicas estão descritos na literatura (KAPER et al., 2004), sendo estes os principais causadores de enfermidades nos suínos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Shiga toxigênica ou verotoxigênica (STEC ou VETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (CHOI & SCHIFFERLI, 2001, BRITO et al., 2004; GYLES et al., 2004; FAIRBROTHER et al., 2005).

### **2.3. *Escherichia coli* e toxinas**

Após se aderirem aos enterócitos, algumas cepas de *E. coli* tornam-se capazes de se multiplicar e produzir um ou mais tipos de toxinas, muitas das quais têm papel importante na

patogênese de diversas doenças (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007; ALFIERI et al., 2010). Diversas toxinas, de origem proteica ou peptídica, produzidas por *E. coli* são conhecidas atualmente. Dentre elas encontram-se as enterotoxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (STa e STb), verotoxinas ou toxinas Shiga-like, enterohemolisina, hemolisina alfa, citotoxina Vir, fator necrotizante citotóxico e toxina distensora citoletal (WILSON & FRANCIS, 1986; GYLES, 1992; FRANCIS, 2002; FRANCIS, 2004).

As enterotoxinas LT e ST são classificadas de acordo com a estabilidade térmica de cada uma, sendo: a LT, inativada a 60°C por 15 minutos e a ST, resistente ao calor de 100°C por 15 minutos. Estas toxinas apresentam particular importância na patogenia das diarreias em leitões recém-nascidos ou pós-desmame (STRAW et al., 2006) por provocarem alterações nos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos e levarem à alteração do equilíbrio hidrossalino do lúmen intestinal, resultando na secreção de eletrólitos e, conseqüentemente, aumento da excreção de fluídos (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Tanto a toxina termolábel, quanto a termoestável provocam diarreia do tipo secretora, entretanto, por mecanismos de ação diferentes, como se segue:

### **2.3.1. Enterotoxinas Termoestáveis (ST):**

As enterotoxinas termoestáveis são divididas em duas classes, STa ou STI e STb ou STII, levando em consideração a sua atividade biológica e solubilidade em metanol, sendo a STa solúvel em metanol e resistente às proteases, enquanto que a STb é insolúvel em metanol e sensível às proteases (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

A toxina STa estimula a produção de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (COWART, 1995; VAANDRAGER, 2002), levando à ativação do CFTR (regulador transmembrana da fibrose cística) dependente da fosforilação da proteína quinase G (DUBREUIL, 2008). Estes eventos levam ao aumento da secreção de Cl<sup>-</sup> e água e inibição da absorção de Na<sup>+</sup> no intestino delgado, conseqüentemente provocando diarreia (VAANDRAGER, 2002; SOBESTIANSKY et al., 2007). Sua principal importância é nas diarreias neonatais, onde também são mais frequentes (FRANCIS, 2004; TURNER et al., 2006; ALFIERI et al., 2010).

Os mecanismos de ação da toxina STb ainda não estão bem compreendidos, entretanto, sabe-se que os nucleotídeos intracitoplasmáticos AMPc (adenosina monofosfato cíclica) ou GMPc não estão envolvidos, como ocorre na STa e LT (DUBREUIL, 2008).

Segundo sugerem Dreyfus et al. (1993), a ação da STb se dá pela estimulação dos canais de  $\text{Cl}^-$  dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (CaCC), elevando seus níveis intracelulares. Essa ação ativa a proteína quinase C e, conseqüentemente, o CFTR. Porém, Peterson e Whipp (1995) sugerem que o estímulo secretório induzido pela ação da STb envolve a ativação do sistema nervoso entérico. Neste processo haveria a síntese de prostaglandina endoperoxidase, levando assim aos mecanismos secretórios (DUBREUIL, 2008). Além de provocar alterações no trânsito e absorção intestinal, a ligação da STb aos enterócitos causa também lesões estruturais no epitélio, como o encurtamento e atrofia de vilosidades, todavia sem alterar os enterócitos presentes nas criptas das vilosidades intestinais (CHAO & DREYFUS, 1997; DUBREUIL, 2008; ALFIERI et al., 2010). Essa enterotoxina foi originalmente relacionada à diarreia em suínos, geralmente detectada em animais com mais de uma semana de idade (ALFIERI et al., 2010), entretanto, também foi encontrada em amostras de *E. coli* humanas (OKAMOTO et al., 1993; TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

### **2.3.2. Enterotoxinas Termolábeis (LT):**

As enterotoxinas termolábeis apresentam semelhanças funcionais, estruturais e antigênicas com a toxina colérica (expressa pelo *Vibrio cholerae*) (DALLAS & FALKOW, 1980; O'BRIEN & HOLMES, 1996), constituindo os determinantes de virulência mais bem caracterizados em cepas de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Estão classificadas em dois subtipos, LT-I e LT-II que, por sua vez, estão divididos respectivamente em LT-Ih (humano), LT-Ip (*pig*), LT-IIa e LT-IIb (DUBREUIL, 2008), codificados por genes localizados em plasmídeos, que por vezes também podem carrear genes que codificam a toxina ST (NATARO & KAPER, 1998; TURNER et al., 2006). Embora possuam mecanismos de ação similares são imunologicamente distintas, além de a toxina LT-I estar associada com doenças em humanos, enquanto a LT-II ser associada primariamente com ETEC espécie-específica (DUBREUIL, 2008).

Uma vez secretada pela bactéria, a toxina se liga aos receptores na célula-alvo, sendo internalizada por endocitose (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Por ação da enterotoxina ocorre aumento da produção de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (NATARO & KAPER, 1998), dependente da proteína quinase A (WIMER-MACKIN et al., 2001). Em seguida, ocorre fosforilação do CFTR resultando no aumento da secreção de  $\text{Cl}^-$  pelas células

das criptas epiteliais e concomitante inibição da absorção de  $\text{Na}^+$  pelos enterócitos das vilosidades intestinais. Consequentemente, ocorre diarreia (SPANGLER, 1992; RAPPUOLI et al., 1999), desidratação, acidose e hipercalemia nos animais acometidos (COWART, 1995).

Outro mecanismo alternativo também pode estar associado à resposta secretora induzida pela enterotoxina LT, como a estimulação do metabolismo do ácido araquidônico, o que potencializa a produção de prostaglandinas e leucotrienos que estimulam o transporte eletrolítico e a mobilidade intestinal (NATARO & KAPER, 1998; TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

### **2.3.3. Outras enterotoxinas comuns em *Escherichia coli* isoladas em diarreia de suínos:**

Uma terceira classe de toxina termoestável é conhecida, semelhante à toxina termoestável classe “a”, e é denominada EAST1, presente geralmente em cepas de *E. coli* enteroagregativas (EAEC), podendo ser eventualmente encontrada em ETEC isoladas de suínos (FRANCIS, 2004; STRAW et al., 2006; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007). Mas, apesar de apresentar 50% de homologia genética com o domínio enterotoxigênico da STa foi considerada diferente das ST. Sua atividade biológica parece ser similar à atividade da STa, uma vez que a partir da exposição da mucosa intestinal, também foi demonstrada elevação na concentração intracitoplasmática de GMPc (SAVARINO et al., 1993).

Outra toxina que pode ser produzida por cepas enterotoxigênicas de *E. coli* é a toxina Shiga-like tipo 2e (STx2e), que está mais relacionada com a doença do edema em leitões pós-desmame, sendo menos importante nas síndromes de diarreias (FRANCIS, 2004; ALFIERI et al., 2010). Entretanto, algumas cepas podem causar tanto diarreia como doença do edema, podendo ocorrer como doenças isoladas ou associadas (FRANCIS, 2002; STRAW et al., 2006).

## **2.4. Colibacilose**

Colibacilose é a enfermidade entérica de maior impacto na suinocultura, especialmente em leitões recém-nascidos e pós-desmame, sendo causada por cepas enterotoxigênicas (CALDERARO et al., 2001; QUINN et al., 2005) ou enteroinvasivas (WADA et al., 2004) de *Escherichia coli*.



A incidência e a severidade desta enfermidade são maiores em sistemas de criação intensivos, o que pode ser um reflexo da grande exposição de animais jovens a linhagens patogênicas de *E. coli* em virtude da perpetuação do agente no meio ambiente, fato visto principalmente em sistemas de produção onde o manejo sanitário não é adequado (FRANCIS, 2002; QUINN et al., 2005). Um grande número de leitões pode ser infectado na sala de maternidade, podendo acometer de uma só vez uma leitegada inteira, o que geralmente resulta em alta mortalidade e morbidade (STRAW et al., 1999).

O início da infecção nos leitões ocorre pela ingestão de bactérias de origem materna e ambiental associada à ausência de defesas naturais, como microbiota normal do intestino e barreira gástrica, além de apresentarem grande número de receptores para fímbrias e alta suscetibilidade às enterotoxinas produzidas por *E. coli* (GYLES et al., 2004).

Uma vez ingeridas, as bactérias se aderem à mucosa intestinal e produzem enterotoxinas que, por sua vez, levam a um quadro de diarreia aquosa profusa nos leitões. Com o progresso da doença, os animais acometidos deixam de se alimentar e evoluem para um quadro de desidratação e fraqueza podendo ocasionar a morte de leitões com até três dias de idade em menos de seis horas (MOON et al., 1999; CALDERARO et al., 2001; QUINN et al., 2005; VANNUCCI & GUEDES, 2009). Nos casos mais graves, a morte dos leitões pode ocorrer sem a observação de diarreia. Nesses casos ocorre desidratação aguda, com acúmulo de líquidos no interior do intestino delgado, podendo atingir um volume equivalente a 30 a 40% do peso corporal (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Os principais sinais clínicos são diarreia com consistência líquida e coloração não hemorrágica, desidratação, prostração e irritação da pele na região perianal devido à alcalinidade das fezes (QUINN et al., 2005; GUEDES, 2006).

Colibacilose neonatal desenvolve poucas alterações patológicas específicas que possam ser atribuídas à doença. Dilatação gástrica (com presença de leite coagulado) e flacidez do intestino delgado, geralmente repleto de líquido amarelado e gás são alterações macroscópicas observadas. Microscopicamente, podem ser vistas bactérias aderidas principalmente às criptas de Lieberkühn, atrofia das vilosidades no intestino delgado, além de congestão da lâmina própria e aumento no número de neutrófilos no local (ALEXANDER, 1994; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007; KONGSTED et al., 2013; ZAJACOVA et al., 2013).

O diagnóstico é baseado na observação dos sinais clínicos, dados epidemiológicos e pouco ou nenhum achado necroscópico. O exame laboratorial com cultura de fezes ou de conteúdo intestinal permite o isolamento e identificação do agente etiológico (QUINN et al., 2005; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007). O diagnóstico diferencial deverá incluir enterotoxemia por *Clostridium perfringens* tipo C, gastroenterite transmissível (infecção por coronavírus), diarreia por desnutrição (associada com agalaxia e hipogalaxia) e coccidioses (NIEWERTH et al., 2001; FARZAN et al., 2013; ZHAO et al., 2013).

O controle da doença em animais é realizado com a utilização de antibioticoterapia específica (HAMPSON & MURDOCH, 2003; SOBESTIANSKY et al., 2007). Estudos recentes demonstram, também, a importância e eficácia de tratamentos alternativos como a homeopatia e a fitoterapia (KIERS et al., 2003; COELHO et al., 2009; JUNG et al., 2011). Entretanto, a melhor forma de controle é o manejo preventivo, que consiste na adoção de programas adequados de limpeza e desinfecção das instalações, especialmente das maternidades e creches, implantação do sistema *all in / all out* (todos dentro / todos fora) e substituição de pisos compactos que acumulam muita umidade, por pisos vazados e suspensos que facilitam a limpeza e evitam o contato dos leitões com as fezes (SOBESTIANSKY et al., 1998; LIPPKE, 2008).

Vacinas comerciais contra a colibacilose neonatal representam outra importante ferramenta na prevenção da doença. Atualmente existem diferentes esquemas vacinais propostos pelos fabricantes ou em estudo tanto para as mães, durante a gestação, quanto para os leitões após o nascimento e desmame. Um dos programas vacinais sugeridos consiste na vacinação de fêmeas gestantes, em duas doses na primo-vacinação (quatro e duas semanas antes do parto) ou uma dose no caso de revacinação (duas semanas antes do parto) (SIMIONATTO et al., 2005; ZHANG & FRANCIS, 2010; LIN et al., 2013).

As vacinas autógenas vêm ganhando destaque nos últimos tempos, sendo empregadas quando não há vacinas comerciais disponíveis ou quando estas não estão controlando a doença adequadamente. Isto pode ocorrer quando o sorotipo presente na granja difere daqueles incluídos na vacina comercial. Para tanto, estudos de caracterização de cepas de *E. coli* são indispensáveis (SOUZA, 2000).

## 2.5. Vacinas

Considerando que os neonatos não apresentam competência imune suficiente e que o início da infecção se dá principalmente pelo contato das bactérias com as mucosas desses

animais recém-nascidos, deve-se buscar desenvolver altos títulos da imunoglobulina A (IgA), que têm como ação a proteção das mucosas, na tentativa de evitar a instalação desta bactéria, sendo este um dos maiores desafios para as novas vacinas (ZHANG et al., 2007; LIN et al., 2013).

Atualmente são comercializadas vacinas para porcas com a finalidade de transmitir imunidade aos leitões na maternidade através de anticorpos (principalmente da classe IgA) produzidos pela mãe e veiculados pelo colostro e/ ou leite (EWING & COLE, 1994; NAGY & FEKETE, 2005). Essas vacinas são inativadas e compostas por um conjunto de diferentes antígenos de *E. coli*, onde os mais comuns são as fímbrias dos tipos F4, F5 e F6 e a enterotoxina LT (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

Devido à suspensão da ingestão de leite ao desmame, as vacinas citadas apresentam um efeito significativo somente para a colibacilose na maternidade, deixando desprotegidos os animais pós-desmame. Neste sentido, vacinas intranasais para leitões desmamados, contendo cepas vivas não patogênicas de *E. coli* portadoras da fímbria F4, já foram testadas. Os resultados observados demonstraram maior resistência às infecções por cepas que expressavam o fator de virulência F4 (EWING & COLE, 1994). Entretanto, vacinas deste tipo ainda não são consideradas alternativas práticas e eficientes, pois não conferem boa imunidade sistêmica (CHEN & SCHIFFERLI, 2003).

Para tentar sanar este problema foi desenvolvida uma vacina utilizando cepa atenuada de *Salmonella* Tythimurium transformada pela inserção de um plasmídeo, que continha genes que codificam adesinas em *E. coli*, na tentativa de elevar a indução de imunidade sistêmica. A vacina foi testada em porcas durante a gestação e em leitões após o desmame, pelas vias intranasal e intramuscular e os resultados obtidos experimentalmente foram satisfatórios (HUR & LEE, 2012).

Devido à grande variabilidade de cepas e de fatores de virulência das *E. coli*, as vacinas devem ser desenvolvidas a partir de estudos prévios, embasados na caracterização das variedades mais comuns em determinada região, a fim de produzir vacinas autógenas, que confirmem boa imunidade contra os antígenos mais frequentes e, portanto, principais desencadeadores da colibacilose nos rebanhos em questão (BARCELLOS et al., 1996; KEN & BILKEI, 2003; SIMIONATTO et al., 2005).

## 2.6. Resistência a antimicrobianos

Uma das formas mais bem sucedidas de quimioterapia na história da medicina é provavelmente a utilização de antimicrobianos. Desde o início do século passado, os antimicrobianos salvaram milhares de vidas no mundo inteiro e são responsáveis por manter sob controle diversas doenças infecciosas que atormentaram a humanidade (AMINOV, 2009).

Na década de 1940, após a introdução dos antimicrobianos na prática clínica, estas drogas foram extremamente eficientes no tratamento de bactérias patogênicas, levando muitos a acreditarem que as doenças infecciosas deixariam de existir. Entretanto, o que se observou foi o surgimento rápido de bactérias resistentes aos antimicrobianos, inclusive micro-organismos multirresistentes, durante as últimas décadas, revelando a falta de conhecimento sobre a evolução e os processos ecológicos que ocorrem nos ecossistemas microbianos (AMINOV, 2009).

Um dos problemas mais relevantes para o tratamento de doenças infecciosas é a aquisição e propagação de determinantes de resistência aos antimicrobianos entre populações bacterianas (ALONSO et al., 2001).

Segundo Summers (2006), os mecanismos de resistência de um dado micro-organismo a um determinado antimicrobiano podem ser classificados inicialmente como intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca é transmitida apenas verticalmente de geração a geração, constituindo parte da herança genética do micro-organismo. Faz parte das características fenotípicas naturais do micro-organismo, sendo a presença ou ausência do alvo de ação do antibiótico o maior determinante de resistência intrínseca (FAJARDO et al., 2008). Já a resistência adquirida deve-se ao aparecimento de resistência em um micro-organismo que anteriormente era sensível à droga em questão. Essa nova propriedade é resultado de alterações estruturais ou bioquímicas da célula bacteriana, determinada por alterações genéticas cromossômicas ou extracromossômicas, devido à aquisição de plasmídeos, transposons, integrons, genes de resistência, entre outros. Nestes casos, uma simples alteração genética pode levar ao aparecimento de uma cepa muito resistente, que normalmente não perde viabilidade nem patogenicidade (SUMMERS, 2006; DÍAZ-MEJÍA et al., 2008; MARTÍNEZ, 2009).

Durante muito tempo acreditou-se que as mutações em genes alvo para a ação dos antimicrobianos seriam a principal causa de resistência antimicrobiana, porém logo se evidenciou que a transferência horizontal de genes, bem como a incorporação de DNA livre

no ambiente e elementos genéticos móveis como bacteriófagos, plasmídeos, transposons e integrons têm papel importante no desenvolvimento e disseminação de resistência aos antimicrobianos entre as bactérias (ALONSO et al., 2001; LEVY & MARSHALL, 2004; LIM et al., 2009). Além disso, a utilização de antimicrobianos em larga escala por humanos e na medicina veterinária acarreta na seleção de bactérias resistentes (REINTHALER et al., 2003).

Na suinocultura, os antimicrobianos vêm sendo utilizados tanto no tratamento das infecções nos animais, quanto nas rações como promotores de crescimento para melhorar a eficiência alimentar do rebanho. Neste caso, as drogas são administradas em subdoses, atuando no controle profilático de infecções pela destruição de bactérias patogênicas que realizariam aderência ao trato gastrointestinal e provocariam doença. Ao mesmo tempo, inibem micro-organismos competidores dos produtores de vitaminas, sendo considerada uma prática fundamental para a total manifestação do potencial genético do animal para crescimento e produção de carne (SOBESTIANSKY et al., 1998; BELLÉ et al., 2009).

Mesmo com a reconhecida importância destes fármacos na suinocultura, seu uso descontrolado e abusivo tem alertado pesquisadores de todas as partes do mundo para os riscos envolvidos nestas práticas, tanto para a saúde humana como animal (SCHMIDT et al., 2000; WHITE et al., 2006; WALLMANN, 2006).

A multirresistência a drogas antimicrobianas já foi identificada em muitos patógenos humanos e animais, reforçando inclusive as evidências de que o surgimento destas bactérias resistentes está associado ao uso dos promotores de crescimento. E um dos fatores que devem ser considerados é a presença de resíduos de antibióticos nos alimentos, o que pode levar ao desenvolvimento de reações de hipersensibilidade (WALLMANN, 2006). Este evento tem causado preocupação também em outros setores da produção animal, como a aquicultura, principalmente em regiões onde dejetos da suinocultura são utilizados como alimento para camarões e peixes (CABELLO, 2006; SCHNEIDER et al., 2009).

A disseminação da resistência aos antimicrobianos entre cepas de *E. coli* tem ganhado destaque entre pesquisadores e clínicos, especialmente pelo fato desta bactéria possuir intervalo entre gerações muito curto, dispondo de mecanismos de transferência de material genético, sendo os plasmídeos o principal deles (SHERLEY et al., 2004). Tais fatos associados à habilidade da *E. coli* em colonizar e persistir em diferentes ambientes e a facilidade do contato com o homem, tornam iminentes os riscos à saúde pública (BEIER et al., 2005), o que tem levado pesquisadores a buscar alternativas para a resolução deste

problema, que vão desde o uso de fitoterápicos e homeopatia no tratamento e prevenção das enfermidade suínas até alterações profundas no manejo dos animais e utilização de vacinas (DALLA COSTA et al., 2001).

## 2.7. Produção de biofilme

A formação de biofilmes foi detectada e relatada em 1943 por Zobell, mas somente a partir da década de 1970 é que diversos estudos têm sido concentrados em identificar e entender sua formação (COSTERTON et al., 1999).

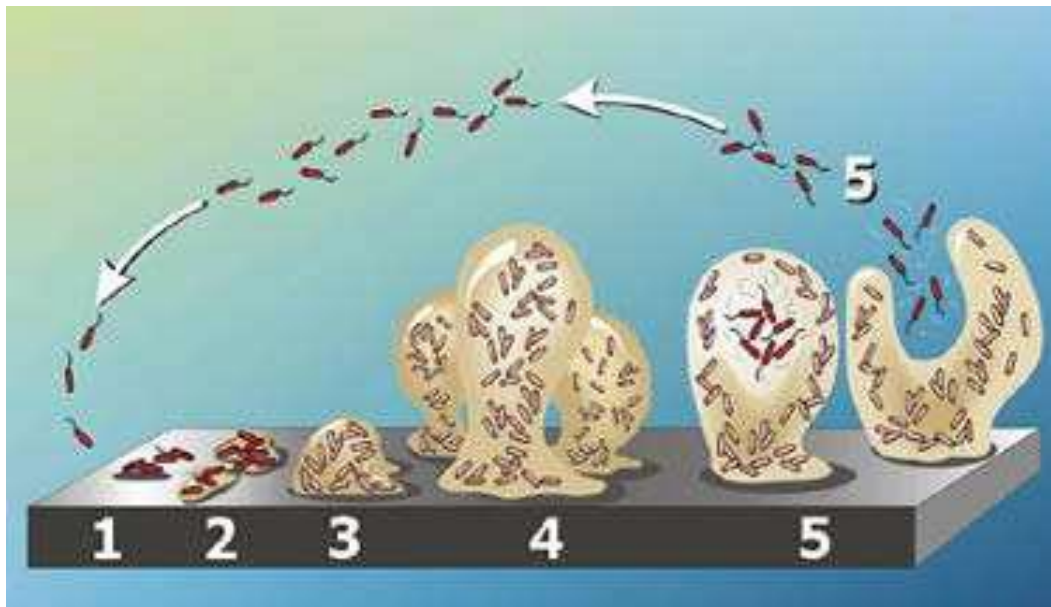
Biofilmes são comunidades de micro-organismos que se desenvolvem em superfícies de ambientes diversos. Ou podem ainda ser definidos como formas de existência microbiana espacialmente e metabolicamente estruturadas em comunidades embebidas em matrizes de substâncias poliméricas extracelulares, exopolissacarídeos (EPS), produzidas pelas próprias células aderidas em superfícies bióticas ou abióticas (DUNNE, 2002; NIKOLAEV & PLAKUNOV, 2007; RIGANO et al., 2007; YANG et al., 2012). Esta matriz extracelular é formada por polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos e DNA extracelular (eDNA) (PETERSEN et al., 2005; PERRY et al., 2009; TETZ et al., 2009; VILAIN et al., 2009).

O desenvolvimento de biofilme sofre interferência direta de vários fatores como a variação de pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio e nutrientes, forças hidrodinâmicas, presença de agentes antimicrobianos, características do substrato em que o micro-organismo se encontra, quantidade do inóculo, bem como a concentração de metabólitos microbianos (NAVES et al., 2008).

Segundo Stoodley et al. (2002), o modelo comum proposto para a formação, diferenciação e constituição de biofilmes maduros é geralmente dividido em cinco etapas (Figura 1):

1. As bactérias livres, ou também conhecidas como planctônicas, estão dispersas no meio e começam a se aproximar de superfícies sólidas através da sua motilidade ou através de fluidos, tendo que superar as forças de repulsão entre a célula e a superfície. Durante esta etapa, a célula bacteriana pode se mover na superfície facilmente, estando sujeita à reversibilidade do processo de adesão mediante interações pela força de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas (KUMAR & ANAND, 1998);

2. Ocorre a transição da fase reversível para a fase irreversível da aderência a partir da produção de polímeros extracelulares (EPS) e/ou pela produção de adesinas específicas na superfície das bactérias como, flagelos e fímbrias, que interagem com a superfície. Dessa forma, esses organismos tornam-se imobilizados ao substrato, iniciando sua multiplicação na superfície de contato e a formação de uma monocamada (KUMAR & ANAND, 1998);
3. Início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme;
4. Nesta etapa as bactérias começam a formar agrupamentos conhecidos como microcolônias no biofilme maduro. Durante este estágio, as substâncias poliméricas extracelulares servem como uma matriz adesiva e possibilitam o acesso aos nutrientes. É nesta etapa, também, que se forma uma complexa arquitetura com estrutura composta por pilares de bactérias rodeados por canais de água que permitem os nutrientes e oxigênio alcançarem o interior do biofilme ao mesmo tempo em que permite que metabólitos excretados difundam-se para fora do mesmo;
5. Na última etapa, ocorre a dispersão das bactérias do biofilme para o ambiente ao seu redor e o ciclo se reinicia (DAVEY & O'TOOLE, 2000; DONLAN & COSTERTON, 2002; DUNNE, 2002; STOODLEY et al., 2002).



**Figura 1.** Representação esquemática das etapas de desenvolvimento de biofilmes. 1- adesão inicial e reversível das células bacterianas na superfície; 2- produção de EPS, tornando a adesão irreversível; 3 e 4- desenvolvimento e maturação da arquitetura do biofilme; e 5- as células são dispersas do biofilme (STOODLEY et al., 2002; MONROE, 2007).

Uma vez consolidada, cerca de 3 a 6 dias após a adesão inicial, a matriz protege as células do biofilme contra a ação de biocidas e de outros agentes antimicrobianos, garante a coesão das células no interior do biofilme e permite a associação com outros micro-organismos, inclusive a coexistência de micro-organismos aeróbios e anaeróbios estritos (KIVES et al., 2006; SCHNEIDER, 2007).

Além dessa proteção, as bactérias que estão crescendo dentro de um biofilme desenvolvem diferenças morfológicas, fenotípicas e bioquímicas quando comparadas àquelas planctônicas. Dessa forma, é comum a presença de bactérias, de uma mesma comunidade de biofilme bacteriano, que possuem diferentes concentrações inibitórias mínimas a antimicrobianos, oferecendo capacidade a patógenos oportunistas de permanecer como agentes infectantes por longo tempo (ITO et al., 2009). Esta resistência tem sido observada amplamente e é atribuída a mudanças fisiológicas como a produção de enzimas degradantes de substâncias antimicrobianas e a redução da taxa de crescimento (KUMAR & ANAND, 1998).

Em virtude dessas características conferidas pelo biofilme em situações adversas, bactérias como *E. coli* podem viver por um certo tempo fora do hospedeiro (PAWAR et al., 2005).



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. GERAL**

Caracterizar aspectos genotípicos e fenotípicos de *Escherichia coli* isoladas de suínos hígidos abatidos em matadouros do estado de Pernambuco.

#### **3.2. ESPECÍFICOS**

- Detectar a presença de genes que codificam fatores de virulência nos isolados de *E. coli*;
- Realizar a caracterização filogenética das *E. coli* isoladas;
- Verificar a presença de DNA plasmidial nas *E. coli* isoladas;
- Verificar o perfil de resistência antimicrobiana das *E. coli* isoladas;
- Detectar a formação de biofilme nas *E. coli* isoladas.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ABIPECS – Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Relatórios e Estatísticas. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mundial/exportacao.html>. Acesso em: 04 out. 2013.
- ALEXANDER, T. J. L. (1994) Neonatal diarrhea in pigs. In: GYLES, C.L. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Guildford: CAB International, 151-170.
- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; BARRY, A. (2010) Diarreias em suínos. In: ALFIERI, A. F.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. A.; et al. (Eds.). Tópicos em Sanidade e Manejo de Suínos. Campinas: Sanphar; Sorocaba: Curuca Consciência Ecológica, 165-184.
- ALMEIDA, Marcelo N. Fatores que contribuem para a falta de uniformidade de suínos de terminação. 2008, 38 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- ALMEIDA, M. N.; GHELLER, N. B.; LIPPKE, R. T.; MORES, T. J.; OLIVEIRA, F. T.; BERNARDI, M. L.; CORBELLINI, L. G.; BARCELLOS, D. E. S. N. (2009) Fatores que contribuem para a falta de uniformidade de suínos de terminação. *Acta Sci Vet*, 37(1): 31-37.
- ALONSO, A.; SÁNCHEZ, P.; MARTÍNEZ, J. L. (2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol*, 3(1):1-9.
- AMINOV, R. I. (2009) The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol*, 11(12):2970-2988.
- BARCELLOS, D.E.S.N.; SOBESTIANSKY, J.; PIFFER, I. (1996) Utilização de vacinas em produção de suínos. Concórdia: EMBRAPA-CNPISA, Periódico Técnico-Informativo Suinocultura Dinâmica, 5(19):10p.
- BARNICH, N.; DENIZOT, J.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. (2013) *E. coli*-mediated gut inflammation in genetically predisposed Crohn's disease patients. *Pathol Biol*, 61(5): 65-69.
- BEIER, R. C.; BISCHOFF, K. M.; ZIPRIN, R. L.; POLLE, T. L.; NISBET, T. J. (2005) Chlorhexidine susceptibility, virulence factors, and antibiotic resistance of beta-hemolytic *Escherichia coli* isolated from neonatal swine with diarrhea. *B Environ Contam Tox*, 75:835-844.
- BELLÉ, J. C.; SILVA, C. A.; BRIDI, A. M.; PACHECO, G. D. (2009) Avaliação de prebióticos como promotor de crescimento para suínos nas fases de recria e terminação. *Semin.- Ciênc Agrár*, 30(2): 471-480.
- BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, J. M.; HERMOSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M. P.; DAHBI, G.; GONZÁLEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M.NI.; BLANCO, J. (2003) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J. Clin Microbiol*, 41:1351-1356.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; GONZÁLEZ, E. A.; GOMES, T. A.; ZERBINI, L. F.; YANO, T.; DE CASTRO, A. F. (1994) Genes coding for Shiga-like toxins in bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) strains belonging to different O:K:H serotypes. *Vet Microbiol*, 42(2-3):105-10.

- BRITO, B. G.; VIDOTTO, M. C.; BERKEL, M. M.; TAGLIARI, K. C. (2004) Fatores de virulência presentes em amostras de *E. coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. *Ciênc Rural*, 34(2):645-652.
- BURCH, D.G.S. (2000) Controlling diarrhoea in growing pigs – the grey scour syndrome. *Pig Journal*, 45:131- 149.
- CABELLO, F.C. (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol*, 8(7):1137-1144.
- CALDERARO, F. F.; BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; FERREIRA, A. J. P.; JEREZ, A. J.; PENA, H. J. F. (2001) Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactentes provenientes de sistemas de produção de suínos do estado de São Paulo. *Arq Inst Biol*, São Paulo, 68(1):29-34.
- CARPENTER, J. A.; BURLATSCHENKO, S. (2005) Diarrhea in nursery pigs associated with multiple concurrent pathogens. *J Swine Health Prod*, 13(4):218–221.
- CHAO, K. L.; DREYFUS L. A. (1997) Interaction of *Escherichia coli* heatstable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infec Immun*, 65(8):3209-3217.
- CHEN, H. D.; FRANKEL, G. (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*, 29:83-98.
- CHEN, H.; SCHIFFERLI, D.M. (2003) Construction, characterization, and immunogenicity of an attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pgtE vaccine expressing Fimbriae with integrated viral epitopes from the spiC promoter. *Infect Immun*, 71:4664–4673.
- CHOI, B-K.; SCHIFFERLI, D.M. (2001) Characterization of fasG segments required for 987P fimbria-mediated binding to piglet glycoprotein receptors. *Infect Immun*, 69(11):6625–6632.
- COELHO, C. P.; SOTO, F. R. M.; VUADEN, E. R.; MELVILLE, P. A.; OLIVEIRA, F. C. S.; BENITES, N. R. (2009) Evaluation of preventive homeopathic treatment against Colibacillosis in swine production. *Int. J High Dilution Res*, 8(29):183-190.
- COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Sci*, 284:1318-1322.
- COWART, R. P. (1995) Colibacillosis. In: COWART, R. P. *An Outline of Swine Diseases: A Handbook*. Iowa: Iowa State University Press, 54-56.
- DALLA COSTA, O. A.; DIESEL, R.; LOPES, E. J. C.; HOLDEFER, C.; COLOMBO, S. (2001) Sistema Intensivo de Suínos Criados ao Ar Livre - SISCAL: Dimensionamento de um sistema. EMBRAPA CNPSA, circular técnica 289, 5p.
- DALLAS, W. S.; FALKOW, S. (1980) Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Nature*, 288:499-501.
- DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64:847-867.

- DÍAZ-MEJÍA, J. J.; AMABILE-CUEVAS, C. A.; ROSAS, I.; SOUZA, V. (2008) An analysis of the evolutionary relationships of integron integrases, with emphasis on the prevalence of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from clinical and environmental origins. *Microbiol*, 154:94-102.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15:167-193.
- DRASAR, B. S.; HILL, M. J. (1974) Human intestinal flora. London, Academic Press Ltd, 36-43.
- DREYFUS, L. A.; HARVILLE, B.; HOWARD, D.E.; SHABAN, R.; BEATTY, D.M.; MORRIS, S.J. (1993) Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA*, 90(8):3202-3206.
- DUBREUIL, J.D. (2008) *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. *FEMS Microbiol Lett*, 278(2):137-145.
- DUNNE, W.M. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinic. Microbiol Rev*, 15:155-166.
- EWING, W. N.; COLE, D. J. A. (1994) *The Living Gut: An Introduction to Microorganisms in Nutrition*. N. Ireland: Context, 220p.
- FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, E.; GYLES, C. L. (2005) *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev*, 6:17-39.
- FAJARDO, A.; MARTÍNEZ-MARTÍN, N.; MERCADILLO, M.; GALÁN, J. C.; GHYSELS, B.; MATTHIJS, S.; CORNELIS, P.; WIEHLMANN, L.; TÜMMLER, B.; BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L. (2008) The Neglected Intrinsic Resistome of Bacterial Pathogens. *PLoS ONE*, 3(2):e1619
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013). Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/610/DesktopDefault.aspx?PageID=610#ancor>. Acesso em 04 out. 2013.
- FARZAN, A.; KIRCANSKI, J.; DELAY, J.; SOLTES, G.; SONGER, J. G.; FRIENDSHIP, R.; PRESCOTT, J. F. (2013) An investigation into the association between cpb2-encoding *Clostridium perfringens* type A and diarrhea in neonatal piglets. *Can J Vet Res*, 77:45-53.
- FRANCIS, D. H. (2002) Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *J Swine Health Prod*, 10(4):171-175.
- FRANCIS, D. H. (2004) Post-weaning *E. coli* - diagnosis, treatment, control, and its effect on subsequent growth performance. *Proceedings...* In: American Association of Swine Veterinarians, Iowa/US, 495-499.
- GUARNER, F.; MELAGELADA, J. R. (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361:512-519.
- GUEDES, R. M. C. Avanços na detecção de patógenos entéricos de leitões jovens. In: Congresso Latino-Americano de Suinocultura, 2006, Foz do Iguaçu. Anais. p.157-161.

- GUO, M.; HAYES, J.; CHO, K. O.; PARWANI, A. V.; LUCAS, L. M.; SAIF, L. J. (2001) Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type Cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. *J Virol*, 75:9239-9251.
- GYLES, C. L. (1992) *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can J Microbiol*, 38:734-746.
- GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 3 ed, Ames: Wiley, 193-214, 2004.
- HAMPSON, D. J.; MURDOCH, A. I. (2003) Further evaluation of a novel polymeric antimicrobial for the control of porcine postweaning colibacillosis. *J Swine Health Prod*, 11(5):223-228.
- HONDA, Suzana N. Avaliação microbiológica do camarão da amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) e sua relação com ambiente de criação na carcinicultura. 2012, 66 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal.
- HUR, J.; LEE, J. H. (2012) Comparative evaluation of a vaccine candidate expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesins for colibacillosis with a commercial vaccine using a pig model. *Vaccine*, 30(26):3829-3833.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Produção da Pecuária Municipal, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>. Acesso em: 04 out. 2013.
- ITO, A.; TANIUCHI, A.; MAY, T.; KAWATA, K.; OKABE, S. (2009) Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *App Environ Microbiol*, 75:4093-4100.
- JACOBSON, M.; LÖFSTEDT, M. G.; HOLMGREN, N.; LUNDEHEIM, N.; FELLSTRÖM, C. (2005) The prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and wild boar population. *J Vet Med*, 52:386-391.
- JUNG, W. C.; CHA, C.N.; LEE, Y. E.; YOO, C. Y.; PARK, E.K.; KIM, S.; LEE, H. J. (2011) Anti-diarrheal effects of a combination of korean traditional herbal extracts and dioctahedral smectite on piglet diarrhea caused by *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Pak Vet J*, 31(4):336-340.
- KAPER, J. B; NATARO, J. P; MOBLEY, H. L. T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, 2:123-140.
- KEN, C.; BILKEI, G. (2003) Effects of vaccination and of a phytogenic feed additive on postweaning mortality due to *Escherichia coli* and on piglet performance. *Vet Rec*, 153(10):302-303.
- KIERS, J. L.; MEIJER, J. C.; NOUT, M. J. R.; ROMBOUTS, F. M.; NABUURS, M. J. A.; VAN DER MEULEN, J. (2003) Effect of fermented soya beans on diarrhoea and feed efficiency in weaned piglets. *J Appl Microbiol*, 95:545-552.

KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOSÉ, C. (2006) Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 52(2):123-127.

KOLLING, Lilian. Classificação filogenética e caracterização patotípica de isolados de *Escherichia coli* patogênicos e comensais de suínos da região Sul do Brasil. 2009, 55 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.

KONGSTED, H.; JONACH, B.; HAUGEGAARD, S.; ANGEN, Ø.; JORSAL, S. E.; KOKOTOVIC, B.; LARSEN, L. E.; JENSEN, T. K.; NIELSEN, J. P. (2013) Microbiological, pathological and histological findings in four Danish pig herds affected by a new neonatal diarrhoea syndrome. *BioMed Cent Vet Res*, 9:206.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol*, 42:9-27.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*, 10(12): 122-129.

LIM, K. T.; YASIN, R.; YEO, C. C.; PUTHUCHEARY, S.; THONG, K. L. (2009) Characterization of multidrug resistant ESBL- producing *Escherichia coli* isolates from Hospitals in Malaysia. *J Biomed Biotechnol*, 1-10.

LIMA, M. S.; DUTRA JUNIOR, W. M.; MARQUEZIN, C.; MELO, B. C. M.; SILVA, E. C.; FALCÃO, D. P.; LIMA, G. H. S.; SILVA, A. P. L.; ARAÚJO, R. F. S. S. Levantamento da população e sistema de criação de suínos da região Agreste de Pernambuco. In: ZOOTEC 2006. Recife – Pernambuco. Anais... 2006. Disponível em: <http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anais-zootec/artigos-cientificos/ensino-extensao/3819-Levantamento-populao-sistema-criao-sunos-regio-agreste-Pernambuco.html>. Acesso em: 10 out. 2013.

LIN, J.; MATEO, K. S.; ZHAO, M.; ERICKSON, A. K.; GARCIA, N.; HE, D.; MOXLEY, R. A.; FRANCIS, D. H. (2013) Protection of piglets against enteric colibacillosis by intranasal immunization with K88ac (F4ac) fimbriae and heat labile enterotoxina of *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*, 162:731-739.

LIPPKE, Ricardo T. Estudo caso controle avaliando a frequência dos principais agentes causadores de diarreia neonatal em suínos. 2008, 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

MARSCHALL, J.; ZHANG, L.; FOXMAN, B.; WARREN, D. K.; HENDERSON, J. P. (2012) Both Host and Pathogen Factors Predispose to *Escherichia coli* Urinary-Source Bacteremia in Hospitalized Patients. *Clin Infect Dis*, 54(12):1692-1698.

MARTÍNEZ, J. L. (2009) The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings, Biol Scie*, 276(1667):2521-2530.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. (2008) Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. *Ciênc Rural*, 38(6):1687-1693.

- MONROE, D. (2007) Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol*, 5(11):2458-2461.
- MOON, H. W.; HOFFMAN, L. J.; CORNICK, N. A.; BOOHER, S. L.; BOSWORTH. (1999) Prevalences of some virulence genes among *Escherichia coli* isolates from swine presented to a diagnostic laboratory in Iowa. *J Diagn Invest*, 11:557-560.
- MOURA, L. B.; FERNANDES, M. G. A (2010) Incidência de Infecções Urinárias Causadas por *E. coli*. *Rev Olhar Cient*, 1(2):411-426.
- NAGY, B.; FEKETE, P. Z. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol*, 295:443-454.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11:142-201.
- NAVES, P.; Del PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ, V.; BLANCO, J.; DAHBI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M. D. C.; SORIANO, F. (2008) Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microb Path*, 45:86-91.
- NIEWERTH, U.; FREY, A.; VOSS, T.; LE BOUGUENEC, C.; BALJER, G.; FRANKE, S.; SCHMIDT, M. A. (2001) The AIDA autotransporter system is associated with F18 and Stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8:143-149.
- NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V. K. (2007) Biofilm: “City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiol*, 76(2):125-138.
- NISHI, S.M.; GENNARI, S. M.; LISBOA, M. N. T. S.; SILVESTRIM, A.; CAPRONI JR., L.; UMEHARA, O. (2000) Parasitas intestinais em suínos confinados nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Arq Inst Biol*, 67(2):199-203.
- O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K. Protein toxins of *Escherichia coli* and *Salmonella*. In: NEIDHART, F.C.; CURTISS, R.; INGRAHAM, J.L.; et al. (Eds.). *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Washington, DC: ASM Press, 2788-2802, 1996.
- OKAMOTO, K.; FUJII, Y.; AKASHI, N.; HITOTSUBASHI, S.; KURAZONO, H.; KARASAWA, T.; TAKEDA, Y. (1993) Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II-producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. *Microbiol Immun*, 37(5):411-414.
- ØRSKOV, I.; JANN, B.; JANN, K. (1977) Serology chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev*, 41:667-710.
- PAWAR, D. M.; ROSSMAN, M. L.; CHEN, J. (2005) Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces. *J App Microbiol*, 99:418-425.
- PEARCE, G. P. (1999) Epidemiology of enteric diseases in growerfinisher pigs: a postal survey of pig producers in England. *Vet Rec*, 27(144):338-342.

- PERRY, J. A.; CVITKOVITCH, D. G.; LÉVESQUE, C. E. (2009) Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 299:261-266.
- PETERSEN, F. C.; TAO, L.; SCHEIE, A. A. (2005) DNA Binding-Uptake System: a Link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *J Bacteriol*, 187:4392-4400.
- PETERSON, J. W.; WHIPP, S. C. (1995) Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infec Immun*, 63:1452-1461.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E., Leonard, F. C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Porto Alegre: ARTMED, 2005, 512p.
- RAPPUOLI, R.; PIZZA, M.; DOUCE, G.; DOUGAN, G. (1999) Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Immun Today*, 20(11):493-500.
- REINTHALER, F. F.; PSOCH, J.; FEIERL, G.; WÜST, G.; HAAS, D.; RUCKENBAUER, G.; MASCHER, F.; MARTH, E. (2003) Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res*, 37(8):1685-1690.
- RIGANO, L. A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SEDÍN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P. S.; QÜESTA, J.; DOW, J. M.; CASTAGNARO, A. P.; VOJNOV, A. A.; MARANO, M. R. (2007) Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*. *Mol Plant Microbe Interact*, 20:1222-1230.
- SAVARINO, S. J.; FASANO, A.; WATSON, J.; MARTIN, B. M.; LEVINE, M. M.; GUANDALINI, S.; GUERRY, P. (1993) Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proceedings... In: National Academy of Science, USA*, 90:3093-3097.
- SCHMIDT, A. S.; BRUUN, M. S.; DALSGAARD, I.; PEDERSEN, K.; LARSEN, J. L. (2000) Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *App Environ Microbiol*, 66(11):4908-4915.
- SCHNEIDER, R. N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. (2009) Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. *Biotemas*, 22(3):11-17.
- SCHNEIDER, R. P. (2007) Biofilmes Microbianos. *Microbiologia em Foco*, 1(2):4-12.
- SHERLEY, M.; GORDON, D. M.; COLLIGNON, P. J. (2004) Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. *Microbiol*, 150(5):1539-1546.
- SIMIONATTO, S.; VAZ, E. K.; MICHELON, A.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A. (2005) Desenvolvimento e avaliação de novas estratégias de imunização contra colibacilose suína. *Pesq Vet Bras* 25(2):84-90.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. *Doenças dos suínos*. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007, 768 p.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L.; OLIVEIRA, S. *Clínica e Patologia Suína*. 2ed. Goiânia-Goiás, 1999, 402p.



- SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P. R. S.; SESTI, L. A. C. Suinocultura intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho. 1 ed, Concórdia: Editora EMBRAPA, 1998, 388p.
- SOUZA, Cybelle. Caracterização sorológica dos antígenos somáticos e perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de suínos com diarreia no estado do Paraná. 2000, 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- SPANGLER, B.D. (1992) Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev*, 56:622-647.
- STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, 56:187-209.
- STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S; TAYLOR, D. J. Diseases of Swine. 8 ed. Ames: Blackwell Science, 431-468, 1999.
- STRAW, B. E.; ZIMMERMAN, J. J.; D'ALLAIRE, S; TAYLOR, D. J. Diseases of Swine. 9 ed. Ames: Wiley, 649-662, 2006.
- STROHL, W. A.; ROSE, H.; FISHER, B. D. Bacilos Entéricos Gram-Negativos in: *Microbiologia Ilustrada*. 1 ed, Porto Alegre: Artmed, p.189-204, 2004.
- SUMMERS, A. O. (2006). " Genetic Linkage and Horizontal Gene Transfer, the Roots of the Antibiotic *Multi*-Resistance Problem." *Anim Biotec*, 17(2):125-135.
- TENG, L. J.; HSUEH, P. R.; LIAW, S. J.; HO, S. W.; TSAI, J. C. (2004) Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. *J Microbiol Immunol Infect*, 37:327-334.
- TETZ, G. V.; ARTEMENKO, N. K.; TETZ, V. V. (2009) Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob Agents Chemother*, 53:1204-1209.
- TIBÚRCIO, Paula. Vantagens na suinocultura. Tecnologia e Treinamento on-line, 17 mai. 2012. Disponível em: <http://www.tecnologiaetreinamento.com.br/abelhas-suinos/suinos/vantagens-na-suinocultura>. Acesso em: 04 out. 2013.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5 ed. São Paulo: Atheneu, p.301-305, 2008.
- TREVISOL, I. M.; ROEHE, P. M. Presença de picobirnavirus em fezes normais e diarréicas de leitões de maternidade. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, VI, 1993, Goiânia. Anais. Goiânia: Comissão científica do VI congresso brasileiro dos veterinários especialistas em suínos, 1993, p.77.
- TURNER, S. M.; SCOTT-TUCKER, A.; COOPER, L. M.; HENDERSON, I. R. (2006) Weapons of mass destruction: virulence factor of the global killer enterotoxigênica *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 263:10-20.
- VAANDRAGER, A.B. (2002) Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C. *Mol Cel Biochem*, 230:73-83.

- VANNUCCI, F. A.; GUEDES, R. M. C. (2009) Fisiopatologia das diarreias em suínos. *Ciênc Rural*, 39(7):2233-2242.
- VIEIRA, M. A. M. (2009) Ilhas de patogenicidade. *O Mundo da Saúde*, 33(4):406-414.
- VILAIN, S.; PRETORIUS, J. M.; THERON, J.; BROZEL, V. S. (2009) DNA as an Adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *App Environ Microbiol*, 75:2861-2868.
- WADA, Y.; KATO, M.; YAMAMOTO, S.; SHIBAHARA, T.; ISHIKAWA, Y.; KADOTA, K. (2004) Invasive ability of *Escherichia coli* O18 isolated from swine neonatal diarrhea. *Vet Pathol*, 41(4):433-437.
- WALLMANN, J. (2006) Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. *Int J Med Microbiol*, 296(41):81-86.
- WHITE, D. G.; FEDOKA-CRAY, P.; CHILLER, T. C. (2006) The National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). *NMC Annual Meeting Proceedings*, 56-60, 2006.
- WILSON, R. A.; FRANCIS, D. H. (1986) Fimbriae and enterotoxins associated with *E. coli* serogroups isolated from clinical cases of porcine colibacillosis. *Am J Vet Res*, 47:213-217.
- WIMER-MACKIN, S.; HOLMES, R. K.; WOLF, A. A.; LENCER, W. I.; JOBLING, M. G. (2001) Characterization of receptor-mediated signal transduction by *Escherichia coli* type IIa heat-labile enterotoxin in the polarized human intestinal cell line T84. *Infec Immun*, 69(12):7205-7212.
- YAEGER, M. J.; FUNK, N.; HOFFMAN, L. (2002) A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diag Invest*, 14:281-287.
- YANG, L.; LIU, Y.; WU, H.; SONG, Z.; HOIBY, N.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. (2012) Combating biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 65:146-157.
- ZAJACOVA, Z. S.; FALDYNA, M.; KULICH, P.; KUMMER, V.; MASKOVA, J.; ALEXA, P. (2013) Experimental infection of gnotobiotic piglets with *Escherichia coli* strains positive for EAST1 and AIDA. *Vet Res Inst*, 152:176-182.
- ZHANG, W.; FRANCIS, D. H. (2010) Genetic fusions of heat-labile toxoid (LT) and heat-stable toxin b (STb) of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* elicit protective anti-LT and anti-STb antibodies. *Clin Vaccine Immunol*, 17(8):1223-1231.
- ZHANG, W.; ZHAO, M.; RUESCH, L.; OMOT, A.; FRANCIS, D. (2007) Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol*, 123:145-152.
- ZHAO, J.; SHIA, B.; HUANG, X.; PENG, M.; ZHANG, X.; HE, D.; PANG, R.; ZHOU, B.; CHEN, P. (2013) A multiplex RT-PCR assay for rapid and differential diagnosis of four porcine diarrhea associated viruses in field samples from pig farms in East China from 2010 to 2012. *J Virol Methods*, 194:107-112.
- ZOBELL, C. E. (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol*, 46(1):39-56.

## **CAPÍTULO 1**

**Análise filogenética, produção de biofilme e perfil de resistência antimicrobiana de  
*Escherichia coli* isoladas de suínos abatidos no estado de Pernambuco**

(A ser submetido ao periódico *Brazilian Journal of Microbiology*)

**ANÁLISE FILOGENÉTICA, PRODUÇÃO DE BIOFILME E PERFIL DE  
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE  
SUÍNOS ABATIDOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO**

**RESUMO**

A suinocultura brasileira vem crescendo ao longo dos anos. Entretanto, enfermidades entéricas de origem bacteriana são frequentes, destacando-se a colibacilose que acomete principalmente leitões e causa grandes prejuízos à indústria suína em todo o mundo. Objetivou-se neste estudo analisar filogeneticamente, verificar a produção de biofilme e determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos em 126 cepas de *E. coli* isoladas de suínos saudáveis abatidos em matadouros do estado de Pernambuco, Brasil. Foram utilizadas as técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), teste de aderência em microplaca e disco difusão, respectivamente. Das amostras analisadas, 3,17% (4/126) foram classificadas no grupo filogenético A; 88,10% (111/126) no grupo B1; 3,97% (5/126) no grupo B2 e 4,76% (6/126) no grupo D. Os antimicrobianos com maior índice de resistência foram eritromicina e lincomicina com 100% (126/126) das cepas resistentes a ambos, seguidos por clortetraciclina 94,44% (119/126), cefalotina 51,59% (65/126), ampicilina 38,89% (49/126), sulfametoxazol + trimetoprim 37,3% (47/126), ciprofloxacina 19,84% (25/126), norfloxacina 14,29% (18/126), gentamicina 8,73% (11/126) e cloranfenicol 5,55% (7/126); o índice de resistência múltipla (IRMA) variou de 0,2 a 0,9. Dos isolados testados, 46,03% (58/126) produziram biofilme e entre as cepas formadoras de biofilme, 98,23% (57/58) foram multirresistentes aos antimicrobianos testados. A maioria dos isolados analisados pertenceu aos filogrupos considerados comensais, mas houve elevada multirresistência antimicrobiana entre os

mesmos, sendo necessários mais estudos para elucidar a importância de cada grupo filogenético para a espécie suína e prevenir a propagação de *E. coli* multirresistente.

**Palavras-chave:** suinocultura, colibacilose, filogenia, antibiograma, multirresistência

## INTRODUÇÃO

A produção de carne suína no Brasil, em 2012, movimentou U\$ 1,49 bilhão somente com exportações, demonstrando a importância econômica desta atividade pecuária, principalmente na região Sul do país. A região Nordeste vem aumentando sua participação na produção suína e, neste contexto, o estado de Pernambuco vem incrementando seu rebanho ao longo dos anos (1, 16). Entretanto, doenças entéricas de origem bacteriana como a colibacilose causa grande impacto econômico na indústria suína, devido às altas taxas de morbidade e mortalidade, além de sequelas no trato gastrointestinal e gastos com antibioticoterapia (18, 29).

A colibacilose é uma enfermidade entérica que acomete principalmente leitões neonatos e pós-desmame causada por cepas toxigênicas de *Escherichia coli*, sendo esta bactéria uma das maiores responsáveis por diarreias em suínos (45).

As cepas de *Escherichia coli* podem ser classificadas em quatro grupos filogenéticos principais (A, B1, B2 e D), onde cepas com maior virulência pertencem aos grupos B2 e D, enquanto cepas consideradas comensais frequentemente são classificadas nos grupos filogenéticos A e B1 (5, 31, 39).

A resistência bacteriana a antimicrobianos é um sério problema tanto na medicina veterinária quanto na humana, devendo-se fazer uso racional de drogas antimicrobianas e, assim, evitando o surgimento de bactérias resistentes nos animais, homem ou no ambiente em que vivem (26). Além disso, o uso abusivo de antimicrobianos, inclusive como promotores de crescimento, leva ao acúmulo de resíduos de antibióticos na carne dos animais, que

posteriormente servirão de alimento para os humanos, podendo causar reações de hipersensibilidade e expondo a microbiota natural a estes agentes (43).

A capacidade de um micro-organismo produzir biofilme está relacionada com o aumento da resistência a agentes antimicrobianos. Estima-se que células de um biofilme são de 100 a 1000 vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos do que células bacterianas planctônicas (9, 27, 33), sendo um importante problema para o tratamento de infecções crônicas (9, 27, 42).

Na região Nordeste do Brasil, dados sobre o perfil sanitário dos rebanhos suínos são escassos e não existem informações sobre a caracterização de cepas de *E. coli* nos rebanhos. Desta forma, objetivou-se neste estudo analisar filogeneticamente, verificar a produção de biofilme e determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos em cepas de *E. coli* isoladas de suínos abatidos para consumo humano em matadouros no estado de Pernambuco, Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Licença N° 032/2013 de 27 de março de 2013).

### **Cepas bacterianas**

Neste estudo foi utilizado um total de 126 cepas de *Escherichia coli*. As cepas foram isoladas a partir de suabes obtidos de fragmentos de intestino delgado de 235 suínos, coletados no momento da evisceração, durante o abate em matadouros públicos, sendo um suabe para cada animal. Estes suabes foram identificados e acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável para serem encaminhados ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LDIC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde foram processados.

No laboratório foram semeados em meio de cultura ágar MacConkey (MERCK®, Jacarepaguá, RJ, Brasil) e incubados a 37°C por 24 a 48 horas. Cepas características foram

submetidas à coloração de Gram, sendo selecionada apenas uma colônia por amostra, e, posteriormente, aquelas que se apresentaram como bacilos Gram negativos foram submetidas a provas bioquímicas, segundo Quinn et al. (35). Após a confirmação bioquímica, cada colônia foi acondicionada em criotubos de 2mL contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (MERCK<sup>®</sup>, Jacarepaguá, RJ, Brasil) e glicerol e estocadas à -20°C até o momento das análises.

### Classificação filogenética

A caracterização filogenética das cepas de *E. coli* foi realizada segundo metodologia descrita por Clermont et al. (5). O DNA dos isolados foi termoextraído segundo Sá et al. (38). Posteriormente procedeu-se a amplificação dos genes *chuA* (279 pb), *yjaA* (211 pb) e do fragmento de DNA TspE4.C2 (152 pb), cujos *primers* estão descritos na tabela 1. As reações foram executadas em um volume de 25 µL por microtubo, contendo 100ng DNA molde, *primers* (30pmol cada), tampão *Taq* (10mM Tris, 50mM KCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>), 200mM dNTPs e 1U *Taq* DNA polymerase (Cenbiot<sup>®</sup>, *Taq*. DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil). O perfil térmico das reações envolveu um passo inicial de 4 min a 94°, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 30s e extensão a 72°C por 30s. O último passo consistiu de extensão final a 72°C por 7 min.

**Tabela 1:** Sequências dos *primers* e tamanhos dos amplicons em pares de bases (pb) observados na PCR para estudo filogenético

Alvo	Sequência (5'-3')	Produtos (pb)
<i>chuA</i>	F - GACGAACCAACGGTCAGGAT	279
	R - TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA</i>	F - TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG	211
	R - ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
TspE4.C2	F - GAGTAATGTTCGGGCATTCA	152
	R - CGCGCCAACAAAGTATTACG	

Fonte: Clermont et al. (5).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

Dependendo da combinação de marcadores observada, os isolados foram classificados em um dos quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D).

### **Deteção da produção de biofilme**

A formação de biofilme foi detectada por meio do teste de aderência em microplacas, segundo Merino et al. (30). A densidade óptica (DO) das amostras foi determinada em leitor de microplaca (Biochrom Expert Plus - Asys<sup>®</sup>, Holliston, MA, EUA) e mensurada com comprimento de onda de 595 nm. Todos os isolados foram testados em triplicata, utilizando-se a cepa de *E. coli* ATCC 35218 como controle positivo e o meio caldo Luria Bertani (HIMEDIA<sup>®</sup>, Curitiba, PR, Brasil) como controle negativo. A partir da média aritmética das DO das triplicatas dos isolados, obteve-se a DO produzida por cada isolado ( $DO_i$ ). Após comparação entre a  $DO_i$  e a DO média produzida pelo controle negativo ( $DO_c$ ), os microorganismos foram agrupados em: não formador de biofilme ( $DO_i \leq DO_c$ ); fraco ( $DO_c \leq DO_i \leq 2xDO_c$ ), moderado ( $DO_c \leq DO_i \leq 4xDO_c$ ) ou forte ( $DO_i > 4xDO_c$ ) formador de biofilme, segundo classificação de Stepanovic et al. (40).

### **Teste de resistência aos antimicrobianos**

O perfil de resistência aos antimicrobianos foi determinado pelo método de disco difusão (2). Foram testados antimicrobianos comumente utilizados na suinocultura (7, 9) conforme segue: ampicilina (10 $\mu$ g), cefalotina (30 $\mu$ g), ciprofloxacina (5 $\mu$ g), cloranfenicol (30 $\mu$ g), clortetraciclina (15 $\mu$ g), eritromicina (15 $\mu$ g), gentamicina (10 $\mu$ g), norfloxacina (10 $\mu$ g), lincomicina (2 $\mu$ g) e sulfazotrim (sulfametoxazol + trimetoprim) (25 $\mu$ g). Os resultados foram interpretados após a leitura dos halos de inibição observados (6). Foi calculado o índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA), considerando multirresistentes as cepas com valor de IRMA maior que 0,2, segundo metodologia descrita por Krumperman (23).



## RESULTADOS

Das 126 cepas de *E. coli* analisadas, 3,17% (4/126) foram classificadas no grupo filogenético A, enquanto 88,10% (111/126) estavam no grupo B1, totalizando 91,27% (115/126) das cepas classificadas em grupos filogenéticos considerados comensais. Já os grupos B2 e D tiveram 3,97% (5/126) e 4,76% (6/126) das cepas, respectivamente, totalizando 8,73% (11/126) das cepas classificadas em grupos filogenéticos considerados virulentos.

Em relação ao teste de resistência aos antimicrobianos, 100% das cepas analisadas foram resistentes a, pelo menos, dois dos antimicrobianos testados e 80,16% (101/126) resistentes a, pelo menos, quatro antimicrobianos. Nenhum isolado foi sensível ou resistente, a todas as drogas testadas. O perfil de resistência aos antimicrobianos testados foi de 5,55% (7/126) para cloranfenicol, seguido por gentamicina 8,73% (11/126), norfloxacinina 14,29% (18/126), ciprofloxacina 19,84% (25/126), sulfametoxazol + trimetoprim 37,3% (47/126), ampicilina 38,89% (49/126), cefalotina 51,59% (65/126), clortetraciclina 94,44% (119/126), eritromicina e lincomicina com 100% (126/126) das cepas resistentes a ambas.

O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) variou de 0,2 a 0,9 com resultado médio de 0,47. Os grupos filogenéticos A e B1 apresentaram, respectivamente, índices médios de 0,58 e 0,47, enquanto que o IRMA médio do grupo B2 foi de 0,44 e de 0,43 para o grupo D.

Entre as cepas testadas, 46,03% (58/126) foram capazes de produzir biofilme. Destas, 84,48% (49/58) foram fracas, 13,80% (8/58) moderada e 1,72% (1/58) forte formadoras do biofilme, sendo 93,10% (54/58) pertencentes aos grupos filogenéticos A ou B1. A produção de biofilme foi detectada em 98,23% (57/58) das cepas multirresistentes aos antimicrobianos testados.

## DISCUSSÃO

O presente estudo detectou que 91,27% (115/126) das cepas analisadas pertenciam aos grupos filogenéticos A ou B1, concordando com os resultados obtidos por Wang et al. (44) que utilizaram cepas isoladas de leitões com diarreia e detectaram maior frequência dos isolados pertencendo aos grupos filogenéticos considerados comensais. Outros estudos realizados anteriormente com isolados de *E. coli* demonstraram que as cepas patogênicas isoladas das espécies suína e bovina estão em sua grande maioria nos grupos filogenéticos A e B1; aquelas isoladas de aves pertencem aos grupos A, B1 e D (13, 14, 21), enquanto as isoladas de humanos pertencem principalmente aos grupos B2 e D (19, 20).

Embora diversos autores apontem os grupos filogenéticos A e B1 como comensais (5, 25, 31, 33, 39), Wang et al. (44) demonstraram que estes grupos filogenéticos são os mais frequentes entre cepas isoladas de suínos com diarreia, sugerindo que para a espécie suína os filogrupos A e B1 têm maior importância patogênica.

Segundo Campos e Trabulsi (4), é fundamental a realização de antibiograma para *E. coli*, considerando os fatores ecológicos, ambientais e genéticos, devido à grande frequência de isolados resistentes à maioria dos antimicrobianos. Este fato foi observado no presente estudo, onde 99,21% (125/126) das cepas apresentaram multirresistência, sendo estes resultados semelhantes aos descritos por Krewer et al. (22) que indicam que tal fato pode significar potencial para transferência horizontal de genes de resistência.

Para Mota et al. (32), elevados índices de resistência múltipla aos antimicrobianos representam alto risco para a saúde pública, uma vez que dificulta o tratamento de enfermidades dos animais e dos humanos. Segundo os mesmos autores, em diversos sistemas de produção da região em estudo, se faz uso indiscriminado de antimicrobianos sem o acompanhamento veterinário, o que poderia agravar a situação de multirresistência.

Os resultados desta pesquisa concordam com os obtidos por Franco et al. (12) e Drummond e Perecmanis (10), que também observaram 100% de resistência a eritromicina e lincomicina, enquanto que ciprofloxacina, norfloxacina e gentamicina foram drogas que apresentaram maior eficiência *in vitro* ao analisarem cepas de *E. coli* isoladas de suínos hígidos.

O índice de resistência observado para cloranfenicol (5,55%) neste estudo demonstra a tendência de diminuição de resistência a essa droga quando analisamos estudos anteriores realizados no Brasil, uma vez que, em 2002, Baccaro et al. (3) encontraram 97% das cepas resistentes a este mesmo antimicrobiano, ao analisarem 600 isolados de *E. coli* provenientes de leitões com diarreia no estado de São Paulo. Dez anos mais tarde, Krewer et al. (22), ao analisarem 62 isolados de *E. coli* de fezes suínas provenientes da região Sul do Brasil, detectaram 16,3% das amostras resistentes a este princípio ativo. Tal comportamento pode ser explicado por uma determinação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por meio da Instrução Normativa Nº 38 de 8 de maio de 2002, que proibiu a fabricação, importação e comercialização de cloranfenicol, nitrofuranos e produtos que contenham estes princípios ativos, para uso na medicina veterinária desde aquela data, o que pode ter interrompido o ciclo de seleção de cepas resistentes, fato ainda observado para as tetraciclínas, que são amplamente utilizadas na profilaxia das diarreias e utilizadas como promotoras de crescimento na suinocultura.

Para os isolados analisados no presente estudo, o IRMA observado foi semelhante para os quatro grupos filogenéticos, embora seja esperado que cepas provenientes de animais e não pertencentes ao grupo filogenético B2 apresentem menos fatores de virulência e maior resistência antimicrobiana, o que seria explicado por variações geográficas e características individuais dos hospedeiros, segundo Sabaté et al. (38).

Dados referentes à produção de biofilme por cepas de *E. coli* isoladas de animais são escassos (28). Entretanto, sabe-se da sua importância na indústria suína, especialmente por tornar os micro-organismos produtores de biofilme mais resistentes à ação de antimicrobianos e desinfetantes (36). Os resultados observados nesta pesquisa, onde 46,03% (58/126) das cepas foram produtoras de biofilme são diferentes dos relatados por Fernandes et al. (11) ao analisar cepas provenientes de mastite bovina e verificar que 100% dos isolados de *E. coli* testados foram capazes de produzir biofilme, porém se assemelham se compararmos com a distribuição por grupos filogenéticos, em que os grupos A e B1 foram os mais frequentes. Diferem ainda dos resultados de Conceição (7), que pesquisou cepas de *E. coli* associadas à sepsse em pacientes humanos e detectou a produção de biofilme em 81,7 % dos isolados.

Estudos previamente realizados por Ito et al. (17) e Ponnusamy et al. (34) demonstram uma relação entre a produção de biofilme e a resistência antimicrobiana. Para Kumar e Anand (24), o motivo de tal relação são as mudanças fisiológicas e estruturais que ocorrem nas células bacterianas como, produção de enzimas degradantes de substâncias antimicrobianas, redução da taxa de crescimento bacteriano e formação de camadas de células bacterianas que impedem o contato entre as drogas antimicrobianas e as células de camadas mais profundas, sendo associada à ocorrência de infecções persistentes e representando um risco à saúde pública e animal (41, 15).

Em conclusão, a multirresistência aos antimicrobianos está disseminada entre cepas de *E. coli*, embora sejam, na sua grande maioria, consideradas comensais. Com isso, a transmissão desses patógenos potenciais ao homem e a outros animais torna-se um risco. Contudo, mais estudos são necessários para elucidar a importância de cada grupo filogenético para a espécie suína, bem como para prevenir a propagação de *E. coli* multirresistente.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelas concessões da bolsa de mestrado (IBPG-0400-5.05/11) e do auxílio mobilidade (AMD-0026-5.05/13), possibilitando a execução deste projeto.

## REFERÊNCIAS

1. ABIPECS – Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. 2013. Relatórios e Estatísticas. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mundial/exportacao.html>. Acesso 04 Out 2013.
2. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45(4):493-496.
3. Baccaro MR, Moreno AM, Corrêa A, Ferreira AJP, Calderaro FF (2002) Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. *Arq Inst Biol* 69(2):15-18.
4. Campos LC, Trabulsi LR (1999) *Escherichia* In: Trabulsi, L.R., Alterthum, F., Gompertz, O.F., Candeias, J.A.N. (eds). *Microbiologia*. Atheneu, Rio de Janeiro, Brasil, 87-148.
5. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66(10):4555-4558.
6. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Testes for Bacteria Isolated From Animals: Approved standard*. Wayne: CLSI.
7. Conceição RA (2010) Formação de biofilme em amostras de *Escherichia coli* associada a sepse (SEPEC): caracterização fenotípica, genotípica e filogenia. Campinas, Brasil, 66p. (M.Sc. Dissertação. Instituto de Biologia. UNICAMP).

8. Costa MM, Silva MS, Spricigo DA, Witt NM, Marchioro SB, Kolling L, Vargas APC (2006) Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. *Pesq Vet Bras* 26(1):5-8.
9. Costerton JW, Stewart PS, and Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
10. Drummond VO, Perecmanis S (2013) Genes de enterotoxinas e perfil antimicrobiano de *Escherichia coli* isoladas de suínos hígidos no Distrito Federal. *Arq Bras Med Vet Zootec* 65(4):1005-1009.
11. Fernandes JBC, Zanardo LG, Galvão NN, Carvalho IA, Nero LA, Moreira MAS (2011) *Escherichia coli* from clinical mastitis: serotypes and virulence factors. *J Vet Diagn Invest* 23(6):1146-1152.
12. Franco RM, Mantilla SPS, Gouvêa R, Oliveira LAT (2010) Resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de carne e dejetos suínos. *Acta Vet Bras* 4(1):31-36.
13. Ghanbarpour R, Salehi M, Oswald E (2010) Virulence genotyping of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis in relation to phylogeny. *Comp Clin Pathol* 19:147-153.
14. Girardini LK, Siqueira FM, Krewer CC, Krewer CC, Costa MM, Vargas AC (2012) Phylogenetic and pathotype analysis of *Escherichia coli* swine isolates from Southern Brazil. *Pesq Vet Bras* 32(5):374-378.
15. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Ag* 35(4):322-332.
16. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011) Produção da Pecuária Municipal 39:1-63.
17. Ito A, Taniuchi A, May T, Kawata K, Okabe S (2009) Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Appl Environ Microbiol* 75(12):4093-4100.

18. Jacobson M, Löfstedt MG, Holmgren N, Lundeheim N, Fellström C (2005) The prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and wild boar population. *J Vet Med* 52(9):386-391.
19. Johnson JR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Winokur PL (2003) Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *J Infect Dis* 188(5):759-768.
20. Johnson JR, Oswald E, O'Bryan TT, Kuskowski MA, Spanjaard L (2002) Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *J Infect Dis* 185(6):774-784.
21. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK (2008) Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J Clin Microbiol* 46(12):3987-3996.
22. Krewer CC, Gressler LT, Costa MM, Krewer CC, Vargas AC (2012) Suscetibilidade a desinfetantes e perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli*. *Pesq Vet Bras* 32(11):1116-1120.
23. Krumperman PH (1983) Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol* 46(1):165-170.
24. Kumar CG, Anand SK (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol* 42(1-2):9-27.
25. Luna GM, Vignaroli C, Rinaldi C, Pusceddu A, Nicoletti L, Gabellini M, Danovaro R, Biavasco F (2010) Extraintestinal *Escherichia coli* Carrying Virulence Genes in Coastal Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol* 76:5659-5668.

26. Macêdo NR, Menezes CPL, Lage AP, Ristow LE, Reis A, Guedes RMC (2007) Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 59(5):1117-1123.
27. Mah T-FC, and O'Toole GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9:34-39.
28. Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J (2006) Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J* 171(3):398-407.
29. Menin A, Reck C, Souza D, Klein C, Vaz E (2008) Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. *Ciênc Rural* 38(6):1687-1693.
30. Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, Lopez JA, Foster TJ, Penadés JR, Lasa I (2009) Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 191(3):832-843.
31. Moreno E, Prats G, Planells I, Planes AM, Pérez T, Andreu A (2006) Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24(8):483-489.
32. Mota RA, Silva KPC, Freitas MFL, Porto WJN, Silva LBG (2005) Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz J Vet Res Anim Sci* 42(6):465-470.
33. Moulin-Schouleur M, Reperant M, Laurent S, Bree A, Mignon-Grasteau S, Germon P, Rasschaert D, Schouler C (2007) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol* 45:3366-3376.



34. Ponnusamy P, Natarajan V, Sevanan M (2012) In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. Asian Pac J Trop Med 5(3):210-213.
35. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Leonard FC (2005) Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Artmed, Porto Alegre.
36. Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S (2006) In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. J Bacteriol 188(10): 3572-3581.
37. Sá MCA, Gouveia GV, Krewer CC, Veschi JLA, Mattos-Guaraldi AL, Costa MM (2013) Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. Genet Mol Biol 36(2):265-268.
38. Sabaté M, Prats G, Moreno E, Balleste E, Blanch AR, Andreu A (2008) Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. Res Microbiol 159(4):288-293.
39. Selander RK, Caugant DA, Whittam TS, (1987) Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. In: Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H.E. (eds). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, 1625-1648.
40. Stepanovic S, Vukovic D, Davic I, Savic B, Vlahovic MS (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microb Meth 40(2):175-179.
41. Stewart PS (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int J Med Microbiol 292(2):107-113.

42. Stewart PS, and Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358:135-138.
43. Wallmann J (2006) Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. *Int J Med Microbiol* 296(41):81-86.
44. Wang X-M, Jiang H-C, Liao X-P, Liu J-H, Zhang W-J, Zhang H, Jiang Z-G, Lu D-H, Xiang R, Liu Y-H (2010) Antimicrobial resistance, virulence genes, and phylogenetic background in *Escherichia coli* isolates from diseased pigs. *FEMS Microbiol Lett* 306(1):15-21.
45. Zhang W, Francis DH (2010) Genetic fusions of heat-labile toxoid (LT) and heat-stable toxin b (STb) of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* elicit protective anti-LT and anti-STb antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 17(8):1223-1231.

## CAPÍTULO 2

**Detecção de plasmídeos, genes de virulência e classificação filogenética de *Escherichia coli* isoladas de suínos abatidos no estado de Pernambuco, Brasil**

(A ser submetido ao periódico *Transboundary and Emerging Diseases*)

## **DETECÇÃO DE PLASMÍDEOS, GENES DE VIRULÊNCIA E CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE SUÍNOS ABATIDOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

### **RESUMO**

Objetivou-se classificar em grupos filogenéticos e caracterizar genotipicamente 126 cepas de *E. coli* isoladas de suínos abatidos no estado de Pernambuco, Brasil, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os grupos filogenéticos mais frequentes foram B1 e D, com 88,10% (111/126) e 4,76% (6/126) dos isolados, respectivamente, enquanto o grupo A teve 3,17% (4/126) e o grupo B2 teve 3,97% (5/126). Das cepas estudadas, 96,83% (122/126) apresentaram genes que codificam fatores de virulência. Dentre os isolados que apresentaram algum gene de virulência, o gene 987P (F6) foi o mais frequente, estando presente em 96,72% (118/122), seguido pelos genes BFP, presente em 90,98% (111/122), K88 (F4) em 18,85% (23/122) e STb em 2,46% (3/122) dos isolados. Nenhuma das amostras foi positiva para os genes LT, STa, STX2e, F5 e F18. 46,03% (58/126) das cepas apresentaram plasmídeo. Este foi o primeiro estudo desta natureza no estado de Pernambuco e um dos poucos já realizados na região Nordeste do Brasil. A detecção de genes que codificam fatores de virulência, assim como de plasmídeos em cepas consideradas comensais e isoladas de animais saudáveis, alerta sobre os riscos de infecções por estas bactérias tanto para os suínos e outros animais, quanto para o homem, tornando-se um problema de saúde pública.

### **INTRODUÇÃO**

A caracterização fenotípica de *Escherichia coli* pode ser realizada por método sorológico (Ørskov et al, 1977; Blanco et al, 2003). Entretanto, necessita de grande variedade de antissoros para uma correta classificação, o que nem sempre está disponível comercialmente (Honda, 2012). Já, a caracterização molecular detecta a presença de genes específicos que codificam diferentes fatores de virulência e permite a classificação patotípica e filogenética dos isolados com alta sensibilidade e especificidade (Strohl et al, 2004; Teng et al, 2004).

Estudos filogenéticos demonstram que isolados de *E. coli* podem ser classificados em quatro grupos principais: A, B1, B2 e D. As cepas consideradas comensais pertencem aos grupos A e B1, enquanto que as cepas virulentas pertencem aos grupos B2 e D (Clermont et

al, 2000) e frequentemente possuem genes que codificam as fímbrias F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18 e BFP e as toxinas LT, STa, STb e STX2e (Hariharan et al, 2004; Afset et al, 2008). Estes fatores de virulência podem estar presentes em plasmídeos, que entre outras características pode determinar a multirresistência antimicrobiana, representando um risco pela possibilidade de co-seleção de genes que codificam resistência e virulência (Dunlop et al, 1999; Schierack et al, 2006).

Existem poucos estudos sobre as características moleculares de isolados de *E. coli* no Brasil (Brito et al. 1999; Costa et al. 2010; Girardini et al, 2012) e, até o momento, nenhum estudo foi registrado no estado de Pernambuco que avalie cepas isoladas de suínos. Considerando esta escassez de dados e os frequentes distúrbios entéricos que ocorrem na produção suína nesta região, objetivou-se neste estudo caracterizar genotipicamente, pela detecção dos genes para toxinas STa, STb, LT e STX2e e adesinas K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F18 e BFP, cepas de *E. coli* isoladas de suínos através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), detectar a presença de plasmídeo e classificá-las entre os grupos filogenéticos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Licença N° 032/2013, de 27 de março de 2013).

### Cepas bacterianas

Neste estudo foi utilizado um total de 126 cepas de *Escherichia coli*. As cepas foram isoladas a partir de suabes obtidos de fragmentos de intestino delgado de 235 suínos, coletados no momento da evisceração, durante o abate em matadouros públicos, sendo um suabe para cada animal. Estes suabes foram identificados e acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável para serem encaminhados ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LDIC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), onde foram processados.

Os suabes foram semeados em ágar MacConkey (MERCK®, Jacarepaguá, RJ, Brasil) e incubados a 37°C por 24 a 48 horas. As colônias características foram submetidas à coloração de Gram, sendo selecionada apenas uma colônia por amostra, e posteriormente, aquelas que se apresentaram como bacilos Gram negativos foram submetidas a provas bioquímicas, segundo Quinn et al. (2005). Após a confirmação bioquímica, procedeu-se a

termoextração de DNA genômico, segundo técnica descrita por Sá et al. (2013), armazenando o DNA extraído em tubos do tipo eppendorf (Eppendorf<sup>®</sup>, Hamburg, Alemanha) à -20°C até o momento das análises.

### **Classificação filogenética**

O estudo filogenético das cepas de *E. coli* foi realizado segundo metodologia descrita por Clermont et al. (2000) pela amplificação dos genes *chuA* (279 pb), *yjaA* (211 pb) e do fragmento de DNA TspE4.C2 (152 pb), cujos *primers* estão descritos na tabela 1. As reações foram realizadas em um volume de 25 µl por microtubo, contendo 100ng DNA molde, *primers* (30pmol each), tampão *Taq* (10mM Tris, 50mM KCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>), 200mM dNTPs e 1U *Taq* DNA polymerase (Cenbiot, *Taq*. DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil). O perfil térmico das reações envolveu um passo inicial de 4 min a 94°, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 30s e extensão a 72°C por 30s. A última etapa consistiu de extensão final a 72°C por 7 min.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados. Dependendo da combinação de marcadores observada, os isolados foram classificados em um dos quatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 e D.

### **Caracterização genotípica**

O DNA dos isolados de *E. coli* foram submetidos à PCR para detecção dos genes de toxinas STa, STb, LT e STX2e e das adesinas K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F18 e BFP conforme descrito previamente por Cleary et al. (2004) e Costa et al. (2006). As sequências iniciadoras das reações estão descritas na tabela 1. Cada par de *primers* foi testado individualmente em reações com volume de 25 µl por microtubo, contendo 100ng DNA molde, *primers* (30pmol each), tampão *Taq* (10mM Tris, 50mM KCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>), 200mM dNTPs e 1U *Taq* DNA polymerase (Cenbiot, *Taq*. DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brasil). O perfil térmico das reações envolveu um passo inicial de 2 min a 94°, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 55°C (65°C para o *primer* BFP) por 45s e extensão a 72°C por 45s. O último passo consistiu de extensão final a 72°C por 5 min. Em seguida, os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

**Tabela 1:** Sequências dos *primers* e tamanhos dos amplicons em pares de bases (pb) observados na PCR para detecção de fatores de virulência

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Fator
<i>chuA</i> <sup>a</sup>	F - GACGAACCAACGGTCAGGAT R - TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	Filogenia
<i>yjaA</i> <sup>a</sup>	F - TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG R - ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	211	Filogenia
TspE4.C2 <sup>a</sup>	F - GAGTAATGTCTGGGGCATTCA R - CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	Filogenia
STa <sup>b</sup>	F - CAACTGAATCACTTGACTCTT R - TTAATAACATCCAGCACAGG	158	Enterotoxina termoestável tipo A
STb <sup>b</sup>	F - TGCCTATGCATCTACACAAT R - CTCCAGCAGTACCATCTCTA	113	Enterotoxina termoestável tipo B
LT <sup>b</sup>	F - GGCGTTACTATCCTCTCTAT R - TGGTCTCGGTCAGATATGT	272	Enterotoxina termolábel
STX2e <sup>b</sup>	F - AATAGTATACGGACAGCGAT R - TCTGACATTCTGGTTGACTC	733	Shiga Toxina II
K88 (F4) <sup>b</sup>	F - GTATCTGTCCGAGAATATCA R - GTTGGTACAGGTCTTAATGG	499	Fímbria de adesão (suíno)
K 99 (F5) <sup>b</sup>	F - AATACTTGTTTCAGGGAGAAA R - AACTTTGTGGTTAACTTCCT	230	Fímbria de adesão (bovino e suíno)
987P (F6) <sup>b</sup>	F - GTAACCTCCACCGTTTGTATC R - AAGTTACTGCCAGTCTATGC	409	Fímbria de adesão (suíno)
F18 <sup>b</sup>	F - TGGTAACGTATCAGCAACTA R - ACTTACAGTGCTATTTCGACG	313	Fímbria de adesão (suíno)
BFP <sup>c</sup>	F - AATGGTGCTTGGCGCTTGCTGC R - TACCAGGTTGGATAAAGCGGC	324	Pili formadora de vesícula

<sup>a</sup>Clermont et al. (2000), <sup>b</sup>Macêdo et al. (2007), <sup>c</sup>Lopez-Saucedo et al. (2003).

### **Conteúdo plasmidial**

A extração de DNA plasmidial foi realizada pelo método alcalino descrito por Birnboim e Doly (1979). Em seguida, uma eletroforese em gel de agarose a 0,7% com posterior visualização e fotodocumentação sob luz ultravioleta foi procedida.

## **RESULTADOS**

O estudo filogenético das 126 cepas de *E. coli* isoladas de suínos sadios e analisadas neste trabalho, revelou que os grupos filogenéticos mais frequentes foram B1 e D, com 88,10% (111/126) e 4,76% (6/126), respectivamente. Por outro lado, os grupos B2 e A foram minoria entre os isolados, representando respectivamente 3,97% (5/126) e 3,17% (4/126) das cepas.

A pesquisa por genes que codificam fatores de virulência revelou que 96,83% (122/126) das cepas os possuíam. Destas, 96,72% (118/122) foram positivas para o gene 987P, 90,98% (111/122) para o gene BFP, 18,85% (23/122) para o gene K88 e 2,46% (3/122) para o gene STb. Nenhum dos isolados apresentou os genes que codificam os fatores de virulência LT, STa, STX2e, F5 e F18. Todos os isolados que apresentaram o gene STb também possuíam os genes de adesina 987P e BFP e apenas um foi positivo para o gene de fímbria K88. Dois dos isolados positivos para o gene STb, que codifica uma enterotoxina termoestável foram classificadas no grupo filogenético B1 e uma no grupo B2. Os plasmídeos estavam presentes em 46,03% (58/126) dos isolados.

## **DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos neste estudo em relação a classificação filogenética dos isolados concordam com os relatados por Girardini et al. (2012), que também detectaram os grupos filogenéticos B1 e D como os mais frequentes ao analisarem cepas de *E. coli* isoladas de suínos provenientes da região Sul do Brasil. Gonçalves (2009) ao analisar isolados de *E. coli* de diversas espécies animais, também detectou o grupo B1 como um dos mais frequentes. Entretanto, outros estudos realizados por Gomes (2012), em cepas oriundas de suínos do Centro-Sul do Brasil, e Picard et al. (1991), em cepas isoladas de humanos na França, revelaram o grupo B2 como o mais frequente.

Segundo Sabaté et al. (2008), *E. coli* de origem animal são consideradas mais resistentes a antibióticos, menos virulentas e classificadas nos grupos filogenéticos A, B1 e D, enquanto as de origem humana pertencem com maior frequência ao grupo B2. Tais diferenças



também podem ser relacionadas a variações geográficas, características individuais dos hospedeiros ou aos insuficientes estudos filogenéticos de amostras suínas (Girardini et al, 2012).

De acordo com Martins et al. (2010), *E. coli* suínas geralmente apresentam prevalência muito baixa de Shiga toxinas, enquanto que as toxinas termolábel (LT) e termoestável (STa e STb) são normalmente identificadas em isolados de suínos com diarreia pós-desmame (Menin et al, 2008). Isto justificaria a baixa frequência da toxina STb e a ausência das demais toxinas nos isolados avaliados no presente estudo, semelhante aos resultados observados por Schierack et al. (2006), Martins et al. (2010) e Drummond e Perecmanis (2013) que também investigaram cepas provenientes de suínos saudáveis.

A elevada ocorrência de genes que codificam adesinas nos isolados deste estudo divergem dos resultados obtidos por Costa et al. (2010) que ao analisarem cepas isoladas de fezes não diarreicas de suínos e ambientais não observaram a presença dos genes F4, F5, F6, F18 e F41. Para Hacker et al. (1997), o simples fato de as cepas possuírem apenas adesinas já deve alertar para o risco destes micro-organismos adquirirem também outros genes de virulência, como toxinas, através de mutações ou transferência horizontal de material genético, tornando-se potencialmente patogênicas e frequentemente envolvidas em enterites nos suínos, como relatado por Costa et al. (2006) e Macêdo et al. (2007).

Segundo Brito et al. (2004) e Teng et al. (2004), plasmídeos podem carrear grande variedade de genes que determinam virulência e, principalmente, resistência às bactérias, facilitando a transmissão desses genes entre diferentes cepas. Dessa forma, cepas já possuidoras de adesinas podem adquirir elementos genéticos móveis que lhes confirmam capacidade de produzir toxinas e vice-versa, tornando-as mais patogênicas para determinadas espécies susceptíveis.

A frequência de plasmídeo nos isolados analisados neste estudo foi elevada, principalmente considerando a existência de outros elementos genéticos móveis como transposons, integrons e bacteriófagos, que também podem transmitir resistência antimicrobiana. Tal resultado corrobora com os encontrados por Costa et al. (2010) que observaram a presença de plasmídeo em 85,9% das cepas diarreio gênicas, 85,7% das cepas obtidas de fezes não diarreicas e em 100% das cepas ambientais analisadas na região Sul do Brasil.

White et al. (2006) afirmam que o uso de uma droga antimicrobiana, principalmente as de amplo espectro, pode induzir a elevação do percentual de cepas resistentes entre bactérias patogênicas e comensais, especialmente pela transferência de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, aumentando a frequência destes entre as cepas. Para Enne et al. (2005), o custo metabólico para manter estes elementos móveis na célula bacteriana é muito baixo, havendo uma tendência em mantê-los na bactéria, mesmo com a diminuição da exposição a estes agentes antimicrobianos de largo espectro. Este fato torna ainda mais relevante os resultados deste estudo, pois apesar de a suinocultura do estado de Pernambuco ser relativamente recente, se comparada às principais regiões produtoras de suínos no Brasil, os mecanismos de transferência de resistência antimicrobiana foram detectados em patamares comparáveis àqueles onde a produção é majoritariamente intensiva e tecnificada, fazendo uso constante de antibióticos na alimentação dos animais como promotores de crescimento há décadas, fato mais recente entre as granjas do estado de Pernambuco, onde muitos animais são criados de forma extensiva ou semi-intensiva.

Este é o primeiro estudo dessa natureza realizado no estado de Pernambuco e um dos poucos já realizados na região Nordeste do Brasil e demonstra a presença de genes que codificam fatores de virulência em cepas consideradas comensais. Algumas destas cepas podem desencadear o surgimento de surtos diarreicos em leitões com possibilidade de transmissão destas bactérias a outros animais e ao homem, tornando-se um problema de saúde pública. Os resultados demonstram a necessidade da realização de mais estudos relacionados à caracterização de cepas de *E. coli* em suínos com distúrbios entéricos nesta região para que possam ser oferecidas estratégias efetivas no controle nos rebanhos afetados.

### **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro concedido (IBPG-0400-5.05/11 e AMD-0026-5.05/13).

### **REFERÊNCIAS**

Afset, J.E., E. Anderssen, G. Bruant, J. Harel, L. Wieler, and K. Bergh, 2008: Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical entero pathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2280-2290.

- Birnboim, H.C., and J. Doly, 1979: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids. Res.* 7, 1513-1523.
- Blanco, M., J.E. Blanco, A. Mora, J. Rey, J.M. Alonso, M. Hermoso, J. Hermoso, M.P. Alonso, G. Dahbi, E.A. González, M.N. Bernárdez, and J. Blanco, 2003: Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1351-1356.
- Brito, B.G., D.S. Leite, R.E. Linhares, and M.C. Vidotto, 1999: Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* - UPEC strains for pigs. *Vet. Microbiol.* 65, 123-132.
- Brito, B.G., M.C. Vidotto, M.M. Berkel, and K.C. Tagliari, 2004: Fatores de virulência presentes em amostras de *E. coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. *Ciênc. Rural*, 34(2), 645-652.
- Cleary, J., L.C. Lai, R.K. Shaw, A.S. Iwanowska, M.S. Donnenberg, G. Frankel, and S. Knutton, 2004: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiol.* 150(Pt 3), 527-538.
- Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen, 2000: Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(10), 4555-4558.
- Costa, M.M., G. Drescher, F. Maboni, S.S. Weber, A. Schrank, M.H. Vainstein, I.S. Schrank, and A.C. Vargas, 2010: Virulence factors, antimicrobial resistance, and plasmid content of *Escherichia coli* isolated in swine commercial farms. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62(1), 30-36.
- Costa, M.M., M.S. Silva, D.A. Spricigo, N.M. Witt, S.B. Marchioro, L. Kolling, and A.P.C. Vargas, 2006: Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 26(1), 5-8.
- Drummond, V.O., and S. Perecmanis, 2013: Genes de enterotoxinas e perfil antimicrobiano de *Escherichia coli* isoladas de suínos hígidos no Distrito Federal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65(4), 1005-1009.
- Dunlop, R.H., S.A. McEwen, A.H. Meek, R.M. Friendship, W.D. Black, and R.C. Clarke, 1999: Sampling considerations for herd-level measurement of faecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in finisher pigs. *Epidemiol. Infect.* 122, 485-496.

- Enne, V.I., A.A. Delsol, G.R. Davis, S.L. Hayward, J.M. Roe, and P.M. Bennett, 2005: Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. *J. Antimicrob. Chemother.* 56(3), 544-551.
- Girardini, L.K., F.M. Siqueira, C.C. Krewer, C.C. Krewer, M.M. Costa, and A.C. Vargas, 2012: Phylogenetic and pathotype analysis of *Escherichia coli* swine isolates from Southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 32(5), 374-378.
- Gomes, V.T.M. 2012: Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de *Escherichia coli* associadas à doença do edema em suínos. M.Sc Dissertação, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil.
- Gonçalves, A.F. 2009: Análise molecular da resistência a antibióticos, factores de virulência e grupos filogenéticos em *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. de animais. M.Sc Dissertação, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.
- Hacker, J., G. Blum-Oehler, L. Mühldorfer, and H. Tschäpe, 1997: Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23(6), 1089-1097.
- Hariharan, H., M. Coles, D. Poole, and P. Robert, 2004: Antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets and calves with diarrhea. *Can. Vet. J.* 45, 605-606.
- Hart, W.S., M.W. Heuzenroeder, and M.D. Barton, 2004: Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and enterococci associated with pigs in Australia. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 51, 216-221.
- Honda, S.N. 2012: Avaliação microbiológica do camarão da amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) e sua relação com ambiente de criação na carcinicultura. M.Sc. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil.
- Lopez-Saucedo, C., J.F. Cerna, N. Villegas-Sepulveda, R. Thompson, F.R. Velazque, J. Torres, P.I. Tarr and T. Estrada-Garcia, 2003: Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.*, 9(1): 127-131.
- Macêdo, N.R., C.P.L. Menezes, A.P. Lage, L.E. Ristow, A. Reis, and R.M.C. Guedes, 2007: Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a

- antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59(5), 1117-1123.
- Martins, R.P., M.C. Silva, V. Dutra, L. Nakazato, and D.S. Leite, 2010: Prevalence of enterotoxigenic end Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in pigs slaughtered in Mato Grosso, Brazil. J. Infect. Dev. Ctries. 5, 123-126.
- Menin A., C. Reck, D. Souza, C. Klein, and E. Vaz, (2008) Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Ciênc. Rural, 38(6), 1687-1693.
- Ørskov, I., B. Jann, and K. Jann, 1977: Serology chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. Bacteriol. Rev. 41, 667-710.
- Picard, B., N. Picard-Pasquier, R. Krishnamoorthy, and P. Goullet, 1991: Characterization of highly virulent *Escherichia coli* strains by ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism. FEMS Microbiol. Lett. 66, 183-188.
- Quinn, P.J., B.K. Markey, M.E. Carter, and F.C. Leonard, 2005: Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas, 1st edn. Artmed, Porto Alegre.
- Sá, M.C.A., G.V. Gouveia, C.C. Krewer, J.L.A. Veschi, A.L. Mattos-Guaraldi, and M.M. Costa, 2013: Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. Genet. Mol. Biol. 36(2), 265-268.
- Sabaté, M., G. Prats, E. Moreno, E. Balleste, A.R. Blanch, and A. Andreu, 2008: Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. Res. Microbiol. 159(4), 288-293.
- Schierack, P., H. Steinrück, S. Kleta, and W. Vahjen, 2006: Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. Appl. Environ. Microbiol. 72, 6680-6686.
- Strohl, W.A., H. Rose, and B.D. Fisher, 2004: Bacilos Entéricos Gram-Negativos in: Microbiologia Ilustrada, 1st edn. Artmed, Porto Alegre.
- Teng, L.J., P.R. Hsueh, S.J. Liaw, S.W. Ho, and J.C. Tsai, 2004: Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. J. Microbiol. Immunol. Infect. 37, 327-334.

White, D.G., P. Fedorka-Cray, and T.C. Chiller, 2006: The national antimicrobial resistance monitoring system (NARMS). NMC Annual Meeting Proceedings, 56-60.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos a partir da caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* isoladas de suínos hígidos abatidos no estado de Pernambuco, Brasil, permitem concluir que:

- Isolados de *Escherichia coli* provenientes de suínos abatidos no estado de Pernambuco foram classificados principalmente nos grupos filogenéticos B1 e D;
- Os principais genes de fatores de virulência presentes nos isolados determinam a expressão de adesinas que estão relacionadas aos mecanismos de interação entre a bactéria e as células do hospedeiro;
- Mesmo sendo classificadas como comensais, *Escherichia coli* podem carrear genes que determinam a expressão de toxinas que incrementam a patogenicidade das cepas, o que pode desencadear o surgimento de diarreias nos suínos;
- Eritromicina e Lincomicina não apresentam eficácia *in vitro* contra cepas de *Escherichia coli* isoladas de suínos no estado de Pernambuco;
- A proibição da produção, importação e comercialização de cloranfenicol na medicina veterinária parece estar contribuindo significativamente para a redução dos índices de resistência a este princípio ativo;
- A quase totalidade dos isolados (99,21%) analisados é multirresistente, o que pode estar relacionado ao uso indiscriminado de drogas antimicrobianas e à presença de elementos genéticos móveis;
- Grande parte dos isolados é capaz de produzir biofilme, favorecendo os mecanismos de resistência antimicrobiana;
- Grande parte dos isolados apresenta plasmídeo, representando alto potencial para transmissão de fatores de virulência e de resistência entre as cepas.

**APÊNDICE**



**APÊNDICE A** – Isolados de *Escherichia coli* de intestino delgado de suínos hígidos utilizados na caracterização fenotípica e genotípica

<b>Isolado</b>	<b>Biofilme</b>	<b>IRMA</b>	<b>Fatores de Virulência</b>	<b>Plasmídeo</b>	<b>Grupo Filogenético</b>	<b>Patotipo</b>
1	Fr	0,6	N	-	A	N/C
2	N	0,7	F4, F6, BFPa	+	B1	EPEC
3	N	0,4	F4, F6, BFPa	+	B1	EPEC
4	N	0,3	F4, F6, BFPa	+	B1	EPEC
5	N	0,3	F4, F6, BFPa	-	B1	EPEC
6	Fr	0,2	F4, F6, BFPa	-	B1	EPEC
7	N	0,5	BFPa	-	D	EPEC
8	N	0,5	F6, BFPa	+	B1	EPEC
9	N	0,4	F6, BFPa	+	B1	EPEC
10	N	0,4	F4, F6, BFPa	+	B1	EPEC
11	N	0,5	F6	-	B1	EPEC
12	Fr	0,4	F4, F6	-	B1	EPEC
13	N	0,4	F4, F6, BFPa	+	B1	EPEC
14	N	0,4	F6, BFPa	-	B1	EPEC
15	N	0,3	F4, F6, BFPa	-	B1	EPEC
16	M	0,5	F6, BFPa	-	B1	EPEC
17	M	0,5	F6, BFPa	+	B1	EPEC
18	N	0,4	F6, BFPa	-	B1	EPEC
19	N	0,6	F6, BFPa	+	B1	EPEC
20	N	0,3	F4, F6, BFPa	+	B1	EPEC
21	N	0,4	F6, BFPa	+	B1	EPEC
22	Fr	0,3	F6, BFPa	-	B1	EPEC
23	N	0,3	F6, BFPa	+	B1	EPEC
24	N	0,5	F6, BFPa	-	B1	EPEC
25	N	0,5	F6, BFPa	+	B1	EPEC
26	Fr	0,4	F6, BFPa	+	B1	EPEC
27	N	0,4	F4, F6	+	B1	EPEC
28	Fr	0,4	F4, F6, BFPa	-	B1	EPEC
29	N	0,3	F4, F6, BFPa	-	B1	EPEC
30	N	0,4	F6, BFPa	-	B1	EPEC
31	Fr	0,6	F6, BFPa	-	B1	EPEC
32	N	0,5	BFPa	+	B1	EPEC
33	Fr	0,6	F6, BFPa	+	B1	EPEC
34	Fr	0,4	F4, F6, BFPa	+	B2	EPEC
35	N	0,4	F6, BFPa	+	B1	EPEC
36	Fr	0,5	F6, BFPa	-	B1	EPEC
37	Fr	0,3	F6	+	B1	EPEC
38	N	0,8	F6, BFPa	-	B1	EPEC
39	N	0,4	F6, BFPa	-	B1	EPEC
40	N	0,6	F6, BFPa	-	B1	EPEC
41	N	0,4	F6, BFPa	-	B1	EPEC
42	N	0,5	F6, BFPa	-	B1	EPEC
43	N	0,5	BFPa	-	D	EPEC

44	N	0,5	F6, BFPa	-	B1	EPEC
45	Fr	0,7	F6, BFPa	-	B1	EPEC
46	Fr	0,5	F6, BFPa	+	B1	EPEC
47	N	0,6	F6	+	A	EPEC
48	N	0,8	F6, BFPa	+	B1	EPEC
49	Fr	0,6	F4, F6, BFPa	+	B1	EPEC
50	N	0,6	F6, BFPa	-	B1	EPEC
51	M	0,5	F6, BFPa	+	B1	EPEC
52	Fr	0,3	N	+	B1	N/C
53	Fr	0,3	F6, BFPa	-	B1	EPEC
54	Fr	0,6	F4, F6, BFPa	+	B1	EPEC
55	N	0,5	F4, F6, BFPa	-	B1	EPEC
56	N	0,6	F6, BFPa	-	B1	EPEC
57	N	0,3	F4, F6, BFPa	+	D	EPEC
58	Fr	0,3	F6, BFPa	+	B1	EPEC
59	Fr	0,4	F6, BFPa	-	B1	EPEC
60	Fr	0,5	F6, BFPa	-	B1	EPEC
61	N	0,6	F6, BFPa	+	B1	EPEC
62	N	0,6	F6, BFPa	+	B1	EPEC
63	N	0,3	F6, BFPa	+	B1	EPEC
64	M	0,7	F6, BFPa	-	B1	EPEC
65	M	0,4	F6, BFPa	-	B1	EPEC
66	N	0,4	F6, BFPa	-	B1	EPEC
67	N	0,3	F4, F6, BFPa	+	B1	EPEC
68	N	0,5	F6	-	B1	EPEC
69	N	0,3	F4, F6, BFPa	-	B1	EPEC
70	Fr	0,3	BFPa	+	A	EPEC
71	N	0,4	F6, BFPa	+	B1	EPEC
72	N	0,8	F6, BFPa	-	B1	EPEC
73	Fr	0,5	F6, BFPa	-	B1	EPEC
74	Fr	0,5	F6, BFPa	-	D	EPEC
75	Fr	0,3	F6, BFPa	+	B1	EPEC
76	Fr	0,5	F6, BFPa	-	B1	EPEC
77	Fr	0,6	F6, BFPa	-	B1	EPEC
78	Fr	0,6	F6, BFPa	-	B1	EPEC
79	Fr	0,6	F6, BFPa	-	B1	EPEC
80	Fr	0,5	F6, BFPa	-	B1	EPEC
81	Fr	0,5	F6, BFPa	-	B1	EPEC
82	Fr	0,6	F6, BFPa	-	B1	EPEC
83	Fr	0,8	F6, BFPa	-	A	EPEC
84	Fr	0,5	F6	-	B1	EPEC
85	Fr	0,6	F6, BFPa	-	B1	EPEC
86	M	0,5	F6, BFPa	+	B1	EPEC
87	Fr	0,4	F4, F6	+	B1	EPEC
88	N	0,3	N	+	D	N/C
89	Fr	0,3	F4, F6, BFPa, STb	-	B1	EPEC
90	M	0,7	F6	-	B1	EPEC
91	Fo	0,9	F4, F6, BFPa	+	B1	EPEC

92	Fr	0,3	F6, BFPa	-	B1	EPEC
93	Fr	0,3	F6, BFPa	+	B1	EPEC
94	Fr	0,3	F6, BFPa	-	B1	EPEC
95	Fr	0,4	F6, BFPa	-	B1	EPEC
96	Fr	0,5	F6, BFPa	-	B1	EPEC
97	Fr	0,3	F6, BFPa	+	B1	EPEC
98	Fr	0,4	F6, BFPa	+	B1	EPEC
99	N	0,5	F6, BFPa	-	B1	EPEC
100	N	0,7	F6, BFPa	+	B1	EPEC
101	Fr	0,3	F6, BFPa	+	B1	EPEC
102	N	0,4	F6, BFPa	+	B1	EPEC
103	N	0,5	F6, BFPa	+	B1	EPEC
104	N	0,4	F6, BFPa	-	B1	EPEC
105	Fr	0,5	F6, BFPa	+	B1	EPEC
106	Fr	0,5	N	+	D	N/C
107	N	0,6	F6, BFPa	+	B1	EPEC
108	N	0,5	F6, BFPa	+	B1	EPEC
109	N	0,4	F6, BFPa	-	B1	EPEC
110	Fr	0,4	F6	+	B1	EPEC
111	Fr	0,4	F6, BFPa	+	B1	EPEC
112	N	0,7	F6, BFPa	+	B1	EPEC
113	N	0,3	F6, BFPa	-	B1	EPEC
114	N	0,6	F6, BFPa	+	B1	EPEC
115	N	0,4	F6, BFPa	+	B1	EPEC
116	N	0,6	F6, BFPa	-	B1	EPEC
117	N	0,6	F6, BFPa	-	B1	EPEC
118	M	0,5	F6, BFPa	+	B1	EPEC
119	N	0,4	F6	-	B2	EPEC
120	N	0,5	F6, BFPa	-	B2	EPEC
121	Fr	0,5	F6, BFPa	-	B1	EPEC
122	N	0,4	F6, BFPa	-	B2	EPEC
123	N	0,5	F6, BFPa, STb	-	B2	EPEC
124	N	0,4	F6, BFPa, STb	+	B1	EPEC
125	N	0,6	F6, BFPa	-	B1	EPEC
126	N	0,3	F6, BFPa	-	B1	EPEC

**Fo**= Forte; **Fr**= Fraco; **M**= Moderado; **N**= Negativo; **N/C**= Não classificada (Negativo para os genes de virulência testados).

**NEXOS**

ANEXO A – Normas para submissão ao periódico *Brazilian Journal of Microbiology*.



ISSN 1517-8382 *printed version*  
ISSN 1678-4405 *online version*

**INSTRUCTIONS TO AUTHORS**

- Scope of the journal
- Submission of a manuscript
- Publication of a manuscript
- Preparation of a manuscript

**SCOPE OF THE JOURNAL**

Brazilian Journal of Microbiology, published by the Brazilian Society of Microbiology, publishes original research papers, short communications, and reviews, covering all aspects of Microbiology. The publication is free of charge.

The following categories of papers are acceptable for publication in Brazilian Journal of Microbiology:

- **Research paper:** the research paper reports results of original research, which has not been published elsewhere.
- **Short Communication:** a Short Communication is a concise account of new and significant findings.
- **Mini-review:** Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest.

Your manuscript must be written in clear, comprehensible English.

If you have concerns about the level of English in your submission, you may choose to have your manuscript professionally edited by a native English speaker or a scientific editing service prior to submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found below. All services are to be arranged and paid for by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication. Please attach the certificate of English editing service during the manuscript submission process. In the case of the author being a native English speaker, please replace the certificate of English editing service by a justification letter.

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: [joroberts@uol.com.br](mailto:joroberts@uol.com.br)
- ATO Traduções: [www.atotraining.com.br](http://www.atotraining.com.br)
- Prof. Julian D. Gross, University of Oxford, Oxford Biomedical Editors: [julian.gross@pharm.ox.ac.uk](mailto:julian.gross@pharm.ox.ac.uk)
- BioMed Proofreading LLC: <http://www.biomedproofreading.com>

**Sections:**

**Industrial Microbiology: Bacterial Fermentation**

- biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by bacteria.
- molecular aspects of bacterial biotechnology

**Industrial Microbiology: Fungal Fermentation**

- biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by fungi
- molecular aspects of fungal biotechnology

**Food Microbiology: Food Technology**

- applications of microorganisms (bacteria and fungi) for food production

**Food Microbiology: Food Safety and Quality**

- food borne diseases
- food spoilage
- microbial ecology in foods

**Medical Microbiology: Bacterial Pathogenesis**

- genetic, biochemical, and structural basis of bacterial pathogenesis

**Medical Microbiology: Clinical Bacteriology**

- studies of medically-important bacteria

**Medical Microbiology: Fungal Pathogenesis**

- genetic, biochemical, and structural basis of pathogenesis of fungi

**Medical Microbiology: Clinical Micology**

- studies of medically-important fungi

**Environmental Microbiology: Microbial Ecology**

- ecology of natural microbial assemblages, microbial diversity of natural environments such as water, soil, sediments and higher organisms
- microbial interactions

**Environmental Microbiology: Biotechnology**

- environmental aspects of public health
- biodegradation
- bioremediation
- environmental considerations for genetically engineered microorganisms

**Fungal Physiology**

- fungal biochemistry, biophysics, metabolism, cell structure, stress response, growth, differentiation and other related process

**Bacterial Physiology**

- bacterial biochemistry, biophysics, metabolism, cell structure, stress response, growth, differentiation and other related process

**Genetics and Molecular Biology of Fungi**

- fungal genetics, molecular biology, gene regulation, DNA replication and repair, genomics, proteomics, transcriptomics

**Genetics and Molecular Biology of Bacteria**

- bacterial genetics, molecular biology, gene regulation, DNA replication and repair, genomics, proteomics, transcriptomics

**Genetics and Molecular Biology of Viruses**

- viral genetics, molecular biology, gene regulation, DNA replication and repair, genomics, proteomics, transcriptomics

**Veterinary Microbiology**

- diseases of animals
- control and/or treatment of animals
- animal pathogen diagnostics
- veterinary or zoonotic pathogens

**Education in Microbiology**

- Teaching strategies in microbiology
- New teaching tools in microbiology

**SUBMISSION OF A MANUSCRIPT**

Submission of a manuscript to Brazilian Journal of Microbiology is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

Upon receipt of a manuscript all authors will receive an electronic message acknowledging the receipt.

Responsibility for the accuracy of the manuscript content lies entirely with the authors.

**PUBLICATION OF A MANUSCRIPT**

Manuscripts are accepted for publication after having been critically reviewed by at least two referees, indicated by the Editors.

The suggestions and recommendations of the reviewers and Editors will be forwarded electronically to the corresponding author, who should return the reviewed manuscript to the Editors within the stipulated date, via online system. Whenever applicable, the corresponding author should explain or comment each modification introduced in the text.

The corresponding author will receive an electronic message whenever the manuscript moves from one status to the next.

Membership in Brazilian Society for Microbiology is not a pre requisite for submission of a manuscript for publication.

Nonmember scientists from Brazil and other countries are invited to submit papers for analysis.

**Ethics:**

When the study, described in the manuscript, is related to experiments carried out with human beings and/or animals, author(s) must inform, within the text, if the research project has been approved by the Research Ethics Committee of their institution, according to the Declaration of Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>). Experimental studies involving animals should follow the guidelines established by the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996), and the *Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (COBEA) (Ethical Principles for Animal Experimentation of the Brazilian College of Animal Experimentation - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>).

**PREPARATION OF A MANUSCRIPT**

The manuscript should be submitted as **one single WORD file**. This single file should include: the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For **research papers**, the **WORD** file should contain:

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract (200 to 250 words)
- Three to five key-words
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgements (optional)
- References

For **short communications**, the **WORD** file should contain:

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract (up to 50 words)
- Three to five key-words
- Text not divided in topics
- Acknowledgements (optional)
- References

For **mini-reviews**, the **WORD** file should contain:

- Title
- Authors and Affiliations



- Abstract (200 to 250 words)
- Three to five key-words
- Text
- Acknowledgements (optional)
- References

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The lines in each page of the manuscript should be numbered too. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission.

Manuscripts written in poor English will not be accepted.

*Research papers* and *mini-reviews* consist of 20 pages, including references, tables and figures.

*Short Communications* should be restricted to 10 pages. Figures and tables should be restricted to a maximum of two figures or two tables, or one table and one figure.

Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission (*Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections*) and the units are to be used according to SI (*International Systems of Units*).

As a rule, the references in the text should be cited by their numbers. When authors are mentioned in the text, the mention should be done according to the following examples: Bergdoll (number) reported that..., Bailey and Cox (number) observed that..., or Smith *et al.* (number) mentioned that...Do not use capital letters.

#### **Suggested reviewers:**

Authors may submit suggestions of reviewers to evaluate the manuscripts. The following information must be provided: reviewer name, e.mail address, and the home institution.

#### **Use of plant extracts in microbiological experiments:**

Articles that present studies with plant extracts, or other complex substances, will be accepted only after identification of compounds.

Authors may need, or wish, to use professional language editing services to improve papers in English and, therefore, overall quality. This assistance is suggested either before an article is submitted for peer review or before it is accepted for publication. Non-native English speakers and international authors who would like assistance with their writing, may likely consider the following options:

- American Journal Experts, English Editing: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: [jroberts@uol.com.br](mailto:jroberts@uol.com.br)
- ATO Traduções: [www.atotraining.com.br](http://www.atotraining.com.br)
- Prof. Julian D. Gross, University of Oxford, Oxford Biomedical Editors: [julian.gross@pharm.ox.ac.uk](mailto:julian.gross@pharm.ox.ac.uk)
- BioMed Proofreading LLC: <http://www.biomedproofreading.com>

**Organization:**

The **Title** should be as brief as possible, contain no abbreviations and be truly indicative of the subject of the paper.

Expressions like "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

The **Abstract** should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper.

The **Introduction** should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

The **Materials and Methods** section should provide enough information for other investigators to repeat the work.

Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

The **Results** section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments. If a *Discussion* section is to be included, avoid extensive interpretation of results but do so in the *Discussion* section. If *Results* and *Discussion* are combined, then results should be discussed where, in the text, is the more appropriate. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text.

The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

The **Discussion** section should discuss the results in relation to the literature cited.

The **References** should be in alphabetical order, by last name of the first author. All authors must be cited. The citations in the text have to be written by the last name(s) of the author(s), followed by the year of publication. As an example, see below: "...while Silva and Pereira (1987) observed that resistance depended on soil density" or "It was observed that resistance depended on soil density (Silva and Pereira, 1987)." For two or more papers by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas (example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000; Hene 2010; Padonou *et al.*, 2012). Journal names should be abbreviated according to the style of *BIOSIS*. All references given in the list should be cited in the text and all references mentioned in the text should be included in the list.

**Examples:****a. Journal article**

Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to

bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz J Microbiol* 37:101-107.

**b. Paper or chapter in a book**

Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. *In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.*(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.

**c. Book**

Montville TJ, Matthews KR (2005) *Food Microbiology - an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

**d. Patent**

Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

**e. Thesis and Dissertations**

Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

**f. Communications in events (Symposia, Conferences, etc)**

Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

**g. Publication in the web**

Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

**h. Webpage**

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

References citing "personal communication" or "unpublished data" are discouraged, although it is recognized that sometimes they must be used. In these cases, they should be cited in the text and not in the list of references. References consisting of papers that are "accepted for publication" or "in press" are acceptable. However, references of papers that are "submitted" or "in preparation" are not acceptable.

**ACKNOWLEDGMENTS:** This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

**TABLES:** should be inserted in the text according to which they are cited, and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them. Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

**FIGURES:** should be inserted in the text according to which they are cited, and numbered sequentially in Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom. Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

**PHOTOGRAPHS:** Should be of sufficient quality to ensure good reproduction. Please, open the following link to see the requirements to obtain the adequate resolution.  
([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

### Conflicts of Interest

It is Brazilian Journal of Microbiology policy that everyone involved in the publication process (authors, reviewers, editorial board members, and editorial staff) must be free from conflicts of interest that could adversely influence their judgment, objectivity or loyalty to the article and assignments. The BJM recognizes that any potential conflict of interest raised must be disclosed promptly to Editor. Conflicts of interest in publishing can be defined as conditions in which an individual holds conflicting or competing interests that could bias editorial decisions. Conflicts of interest may be only potential or perceived, or they may be factual. Personal, political, financial, academic, or religious considerations can affect objectivity in numerous ways.

### AUTHORS' COPYRIGHT

Upon receipt of the galley proofs for approval, authors of approved manuscripts should fax or email the Author's Copyright Statement to the BJM (55-11-3037-7095, [bjm@sbmicrobiologia.org.br](mailto:bjm@sbmicrobiologia.org.br)). The statement (see text below) must be signed by at least one of the authors (who agrees to inform the other authors, if any).

### TRANSFER OF AUTHORS' COPYRIGHT

"The undersigned author(s) state(s) that the article being submitted is original, does not infringe copyright laws or any other third-party property rights, has not been previously published, and is not being considered for publication elsewhere. The author(s) confirm(s) that the final version of the manuscript has been reviewed and approved by all authors. All manuscripts published become the permanent property of the Brazilian Journal of Microbiology and can not be published without authorization in writing from its Editors."

Article No. \_\_\_\_\_

Title of the article:

" \_\_\_\_\_ "

Name(s) of the author(s) \_\_\_\_\_ Signature(s)

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Date: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

[Home] [About this journal] [Editorial board] [Subscription]



All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons License

Sociedade Brasileira de Microbiologia

USP - ICB III - Dep. de Microbiologia

Av. Prof. Lineu Prestes, 2415

Cidade Universitária

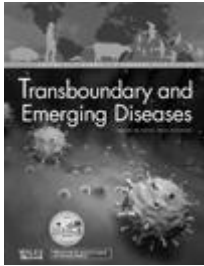
05508-900 São Paulo SP - Brasil

Tel: +55 11 3813-9647/3037-7095



[bjm@sbmicrobiologia.org.br](mailto:bjm@sbmicrobiologia.org.br)

**ANEXO B** – Normas para submissão ao periódico *Transboundary and Emerging Diseases*.  
**Transboundary and Emerging Diseases**  
 © Blackwell Verlag GmbH



**Edited By: Paul Kitching, Marta Sabara, Gavin Thomson and Dirk Werling**

**Impact Factor: 2.096**

**ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: 10/143 (Veterinary Sciences); 46/70 (Infectious Diseases)**

**Online ISSN: 1865-1682**

## **AUTHOR GUIDELINES**

### **Content of Author Guidelines:**

1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Submission of Manuscripts, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance.

**Relevant Documents:** Colour Work Agreement Form

**Useful Websites:** Submission Site, Articles published in *Transboundary and Emerging Diseases*, Author Services, Blackwell Publishing's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

### **1. GENERAL**

*Transboundary and Emerging Diseases* brings together in one place the latest research on infectious animal diseases considered to hold the greatest economic threat to animals worldwide. The journal provides a venue for global research on the sources favoring their diagnosis, prevention and management, and for papers on veterinary public health, pathogenesis, epidemiology, statistical modeling, diagnostics, biosecurity issues, genomics, vaccine development and rapid communication of new outbreaks.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Transboundary and Emerging Diseases*. Authors are encouraged to visit Wiley Blackwell Publishing's Author Services further information on the preparation and submission of articles and figures.

### **2. ETHICAL GUIDELINES**

*Transboundary and Emerging Diseases* adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

#### **2.1. Authorship and Acknowledgements**

**Authorship:** Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

*Transboundary and Emerging Diseases* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

**Acknowledgements:** Under Acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. **Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.**

## 2.2. Ethical Approvals

**Experimental Subjects:** experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 [www.wma.net/e/policy/b3.htm](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm)) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

**Ethics of investigation:** Papers not in agreement with the guidelines of the Helsinki Declaration as revised in 1975 will not be accepted for publication.

## 2.3. Appeal of Decision

Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by e-mailing the editorial office with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

## 2.4. Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

## 2.5. Copyright Assignment

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

### For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

### For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services

[http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit

<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

## 3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site ScholarOne Manuscripts. The use of an online submission and peer review site speeds up the decision-making process, enables immediate distribution, and allows authors to track the status of their own manuscripts. If assistance is needed (or if for some reason online submission is not possible), the Editorial Office can be contacted and will readily provide any help users need to upload their manuscripts.

**Editorial Office:** Iduna Haus

**email:** [iduna-haus@ethz.ch](mailto:iduna-haus@ethz.ch)

**Online Submission:** To submit a manuscript, please follow the instructions below.

### 3.1. Getting Started

1. Launch your web browser (Internet Explorer 5 or higher or Netscape 7 or higher) and go to the journal's Manuscript Central homepage (<http://mc.manuscriptcentral.com/tbed>).
2. Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user of Manuscript

Central.

3. If you are creating a new account.

- After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
  - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
  - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
4. Log-in and select 'Author Center.'

### **3.2. Submitting Your Manuscript**

1. After you have logged in, click the 'Submit a Manuscript' link in the menu bar.
2. Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
3. Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
4. You are required to upload your files.
  - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
  - Select the designation of each file in the drop-down menu next to the Browse button.
  - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
5. Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. After submission, you will receive a confirmation e-mail. You can also access Manuscript Central any time to check the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

### **3.3. Manuscript Files Accepted**

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but *no* embedded figures. Figure tags should be included in the file. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

Revised manuscripts must be uploaded within 2 months of authors being notified of conditional acceptance pending satisfactory revision.

Reviewers evaluate the papers, the Editors decide on acceptance, changes, or rejection. No changes will be made without the approval of the author. Your manuscript will be destroyed three months after publication. Only appropriately marked originals will be returned. The publisher cannot be held responsible for any damage or loss through the post.

### **3.4. Blinded Review**

All manuscripts submitted to *Transboundary and Emerging Diseases* will be reviewed by two experts in the field. *Transboundary and Emerging Diseases* uses single-blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.



#### 4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

**Original Articles** should not exceed 30 typewritten pages, including illustrations, tables and references.

**Review Articles** including illustrations, tables and literature references - should not exceed 40 typewritten pages (format DIN A4 or 8.5 × 11'). The number of illustrations and tables must be kept to a minimum.

**Rapid Communications** are a concise but complete description of a limited investigation of a newly emerging pathogen or disease situation of high importance for either or both animal and human health. Rapid Communications will be published on an accelerated turn-over to ensure fast dissemination of the content, reflecting the importance of the topic. They should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper and not exceed 6 printed pages with figures, tables and references (about 12 manuscript pages including no more than a total of 4 figures and tables). Headings should be Introduction, Materials and Methods with the Results and Discussion combined and a maximum total text word count of 3000.

**Short Communications** should not exceed 5 typewritten pages, including figures, tables and references. Short Communications may be published more rapidly.

#### 5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

##### 5.1.Format

**Language:** The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscripts are professionally edited. Visit our site to learn about the options. Please note that using the Wiley English Language Editing Service does not guarantee that your paper will be accepted by this journal.

**Abbreviations, Symbols and Nomenclature** All specifications must be stated according to the S.I. system. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight).

Any abbreviations of chemical, biological, medical or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in brackets when the abbreviation is first used.

All biological, medical, chemical or other terms should be used according to the most recent recommendations of the respective international nomenclature. Enzymes should be given in I.U. (International Units), according to *Enzyme Nomenclature* (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, when they are first mentioned in the text, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote. Products (preparations etc.) with a registered trademark should be marked with ®.

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses.

Names of micro-organisms and zoological names will be printed in italics and should be underlined in the manuscript.

## **5.2. Structure**

All manuscripts submitted to *Transboundary and Emerging Diseases* should include:

On page one of the manuscript, please include the corresponding author, name of the institution, place where the work was carried out, title of the manuscript, short title for running head of manuscript, names of the authors, the addresses of the authors and the e-mail address of the corresponding author. Each original article should be divided into Summary and Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and References. Summaries should not be longer than 300 words and up to six keywords should be provided.

The manuscript comprises the text and a list of all figures and tables with their captions and titles in a separate file. We ask that you convey the essential information within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text. For all figures please include reproduceable artwork (marked with the author's name, short title, and figure number). Any corrections requested by the reviewer should already be integrated into the file.

The data files must be PC/Windows-compatible. Please send the figures as separate files and do not import them into the text file. The text should be prepared using standard software (Microsoft Word, Word Perfect) or saved in rtf format; do not use automated or manual hyphenation. Please do not include footnotes.

### **Optimizing Your Abstract for Search Engines**

Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimizing your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/or cited in another work. We have compiled these guidelines to enable you to maximize the web-friendliness of the most public part of your article.

## **5.3. References**

Each original paper should include bibliographical references which should be restricted to the necessary minimum. The name of the journal in which the paper cited appears should be listed in the form of the abbreviated title from the cover of the journal concerned, otherwise use the abbreviations contained in a *Bibliographic Guide for Editors & Authors* from Chemical Abstracts, which is available in all major libraries, or the *World List of Scientific Periodicals*, 4th ed., London 1963-65. Anonymous contributions should be placed at the beginning of the list of references. The list of references should be in alphabetical order of first authors' names.

Please ensure that references in the text exactly match those in the manuscript's reference list. If editing sections of text please ensure that any references that are affected are amended accordingly in the reference list. Reference to personal communications and unpublished results should be in the text only i.e. (Animal Health Care Flanders, personal communication, 2006) or (Zhang, F., unpublished results). Examples:

**Journal**

Valarcher, J.-F., Y. Leforban, M. Reweyemamu, P.L. Roeder, G. Gerbier, D.K.J. Mackay, K.J. Sumption, D.J. Paton, and N.J. Knowles, 2008: Incursions of foot-and-mouth disease virus into Europe between 1985 and 2006. *Transbound. Emerg. Dis.* 55, 14-34.

**Book**

Agresti, A., 2002: *Categorical Data Analysis*, 2nd edn. Wiley, New York.

**Chapter in Edited Book**

Thomson, G.R., and A.D.S. Bastos, 2004: Foot-and-mouth disease. In: Coetzer, J.A.W., and R.C. Tustin (eds), *Infectious Diseases of Livestock*, 2nd edn. pp. 1324-1365. Oxford University Press, South Africa.

**Report**

Sealander, J. A., P. S. Gipson, M. E. Cartwright, and J. M. Pledger, 1975: *Behaviour and Physiological Studies of Relationships between White-tailed Deer and Dogs in Arkansas*. Final Report to Arkansas Game and Fish Commission. Department of Zoology, University of Arkansas, Fayetteville.

**PhD thesis**

Author, A. 2003: Thesis title with lower case initials to all words. PhD thesis, University, Town, Country.

**Web Page**

American Veterinary Medical Association, 2006: Equine Influenza Background. Available at: [http://www.avma.org/public\\_health/influenza/equine\\_bgnd.asp](http://www.avma.org/public_health/influenza/equine_bgnd.asp) (accessed 22 October 2007).

References in the text to literature in the Reference List should be given by placing in parenthesis the name(s) of the author(s), adding the year of publication (e.g.: Smith and Jones, 2003). For more than two authors, first author plus et al is used (e.g.: Sealander et al, 1975).

The editor and publisher recommend that citation of online published papers and other material should be done via a DOI (digital object identifier), which all reputable online published material should have - see [www.doi.org/](http://www.doi.org/) for more information. If an author cites anything which does not have a DOI they run the risk of the cited material not being traceable.

**5.4. Tables, Figures and Figure Legends**

Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for reproduction. Please do not use any pixel-oriented programs. Photographs or drawings submitted for publication with the manuscript must be of high quality, distinct and well-focused, if they are to be suitable for reproduction. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Please submit the data for figures in black and white. However, colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast).

Figures printed in colour are subject to an added charge. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, *Transboundary and Emerging Diseases* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). Colour print charges are explained on the Colour Work Agreement Form.

**Colour Charges:** It is the policy of *Transboundary and Emerging Diseases* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley Blackwell requires you to complete and return the Colour Work Agreement Form before your paper can be published. Any article received by Wiley Blackwell with colour artwork will not be published until the form has been returned.

Please return the original signed form by post to the address below:

Customer Services (OPI)  
John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre  
New Era Estate  
Oldlands Way  
Bognor Regis  
West Sussex  
PO22 9NQ

Colour graphics should be created using the RGB mode. There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher.

Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. If a figure is to be cropped, please mark the lines on a photocopy or tracing paper. Printouts should be made with a laser printer at the highest resolution ( $\geq 600$  dpi). If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible.

Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Tables should be created using the table function. In the case of figures or tables taken from already published material, their source must be stated, and copyright waivers must be obtained.

Further information can be obtained at Wiley Blackwell Publishing's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting  
it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

**Figure & Table Legends:** please ensure the essential information is within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition.

**Permissions:** If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publisher.

### **5.5.Supporting Information**

Publication in electronic formats has created opportunities for adding details or whole sections in the electronic version only. Authors need to work closely with the editors in developing or using such new publication formats.

Supporting Information, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted.

It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Information is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the Supporting Information is such that it cannot be accommodated on the Journal's website, the author agrees to make the Supporting Information available free of charge on a permanent website, to which links will be set up from the Journal's website. The author must advise Wiley Blackwell Publishing if the URL of the website where the Supporting Information is located changes. The content of the Supporting Information must not be altered after the paper has been accepted for publication.

The availability of Supporting Information should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting Information' and providing titles of figures, tables, etc. In order to protect reviewer anonymity, material posted on the author's website cannot be reviewed. The Supporting Information is an integral part of the article and will be reviewed accordingly.

**Extra issues:** Larger papers or monographs may be published as additional issues (numbered as the ordinary issues), the full cost being paid by the author. Further information may be obtained from the editor.

## **6. AFTER ACCEPTANCE**

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

### **6.1.Proof Corrections**

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following website:  
[www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html](http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html) . This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Proofs must be returned to the typesetter within three days of receipt. Please note that if you have registered for production tracking e-mail alerts in Author Services, there will be no e-mail for the proof corrections received stage. This will not affect e-mails alerts for any later production stages.

As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

### **6.2. Early View (Publication Prior to Print)**

*Transboundary and Emerging Diseases* is covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

### **6.3. Author Services**

Online production tracking is available for your article through Wiley Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

### **6.4. Author Material Archive Policy**

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

### **6.5. Offprints and Extra Copies**

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: [offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE\\_ID=bw&a](http://offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&a)

## **7. ONLINE OPEN**

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Online Library, as well as deposited in the funding agency's

preferred archive. For the full list of terms and conditions, see [http://onlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen\\_Terms](http://onlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms)


Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: [https://authorservices.com/bauthor/onlineopen\\_order.asp](https://authorservices.com/bauthor/onlineopen_order.asp)

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

**ANEXO C – Parecer de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE.**

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE sob protocolo N° 23082.005013/2013, tendo sido aprovado em 29 de abril de 2013 sob licença N° 032/2013.

A Comissão de Ética no uso de animais, na sua reunião de 29 104 1 2013,  
APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Assinatura: \_\_\_\_\_ *Carlos Antônio Alves Pontes*  
Coordenador da Comissão  **Carlos Antônio Alves Pontes**  
Presidente  
CEUA - UFRPE

