

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS, PREVALÊNCIA DOS FATORES ASSOCIADOS  
À VIRULÊNCIA, TIPAGEM FILOGENÉTICA E PERFIL FILOGENÉTICO DE ISOLADOS  
DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA AVIÁRIA (APEC)**

Dissertação de Mestrado

**Nicolle Lima Barbieri**

Porto Alegre, março 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS, PREVALÊNCIA DOS FATORES ASSOCIADOS  
À VIRULÊNCIA, TIPAGEM FILOGENÉTICA E PERFIL FILOGENÉTICO DE ISOLADOS  
DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA AVIÁRIA (APEC)**

**Nicolle Lima Barbieri**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientação : Profa Dra Fabiana Horn

Porto Alegre, março 2010

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Celular, situado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

*Dedico este trabalho  
a meus pais, meu irmão e  
meu namorado Carlos  
por todo apoio e carinho  
durante a minha jornada.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Fabiana Horn, por ter acreditado em mim e por todo apoio, não só científico, e pela amizade.

Ao Dr. Benito Brito, por ter me fornecido os isolados, sem os quais não seria possível realizar esse trabalho.

Aos professores Jeverson Frazzon e Irene Silveira Schrank, membros da Comissão de Acompanhamento, pelos incentivos.

Ao professor Alexandre José Macedo, por ser meu Revisor da Dissertação e por ser sempre tão solícito.

Ao Luciano Saucedo e à Silvia Regina Centeno por serem sempre tão prestativos e atenciosos.

A minhas colegas de laboratório e amigas, Letícia Beatriz Matter e Roberta Souza dos Reis, por todo apoio, força e amizade durante esse período.

Aos alunos de iniciação científica, Daniel Brisoto Pavanelo e Aline Luísa de Oliveira, por todo apoio e companheirismo.

Aos amigos e colegas dos laboratórios 107, 207, 214 e 217, por toda amizade, apoio técnico e ensinamentos.

Aos meus pais, por serem os meus primeiros educadores, e com isso me ensinarem a dar valor à educação.

Ao meu irmão por todo apoio e suporte técnico, nos mais diversos momentos.

Ao meu namorado Carlos, por todo amor, apoio e compreensão.

E a todos os meus amigos, que estiveram sempre confiantes em mim e mesmo, não tão próximos, me deram muito carinho e compreenderam as minhas ausências.

## RESUMO

*Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) é a causa de doenças extra-intestinais em aves, que se manifestam na forma de doenças localizadas ou infecções sistêmicas, gerando grandes perdas econômicas para a indústria aviária. O objetivo desse trabalho foi estudar isolados de APEC do sul do Brasil em relação à resistência a agentes antimicrobianos; a prevalência de fatores associados à virulência; a tipagem filogenética e o perfil filogenético.

Na avicultura, os agentes antimicrobianos são muito utilizados na prevenção de infecções e na forma de promotores de crescimento. Foram utilizadas 41 isolados de *E. coli* obtidos de infecções sistêmicas e 144 isolados de celulite, utilizando o método de difusão com discos. Isolados APEC apresentaram baixos níveis de resistência, com exceção da tetraciclina e das sulfonamidas; e para isolados de colissepticemia, também foi observado uma resistência aos antimicrobianos que atuam na parede celular (ampicilina, cefalotina, bacitracina e ceftiofur).

Vários fatores de virulência têm sido investigados em cepas APEC, os que têm sido mais frequentemente associados com a patogenicidade são as fímbrias de aderência F1 e Tsh (hemaglutinina sensível à temperatura); o sistema sideróforo aerobactina, a proteína iss (*increased serum survival*), a cápsula K e a produção de colicina V. Foram realizadas reações da polimerase em cadeia multiplex (PCR), testando um total de 33 fatores nos isolados APEC. Os fatores relacionados a adesão, sideróforos e resistência ao soro foram presentes em todas as amostras. Os fatores que apresentaram maior prevalência nas amostras foram, *fimC*, *ompA*, *crlA* e *traT*.

A tipagem filogenética foi realizada através do método descrito por Clermont *et al.*, (2000), que permite separar os isolados em 4 grupos filogenéticos principais (A, B1, B2 e D). Observamos a maior presença de isolados APEC pertencentes ao grupo D, tanto para celulite quanto para colissepticemia.

A análise do perfil filogenético foi realizada pelo método ARDRA, que é baseado na variação da região do espaçamento intergênico (ISR) na região 16S-23S do DNA ribossômico. Os resultados foram analisados formando um dendrograma que mostra a proximidade filogenética dos isolados, indicando que não foi possível separar os clones de celulite dos de colissepticemia e não existem clones endêmicos nas regiões analisadas.

Os resultados obtidos no presente estudo, fornecem um panorama geral da resistência aos agentes antimicrobianos, prevalência dos fatores de virulência, tipagem filogenética e perfil filogenético encontrados nos isolados de *E. coli* aviária do sul do Brasil de infecções de colissepticemia e celulite.

**Uni-termos:** *Escherichia coli*; APEC; colibacilose; celulite; colissepticemia; suscetibilidade a antimicrobianos; fatores de virulência; ARDRA; análise filogenética.

## ABSTRACT

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is the etiological agent of localized or systemic extra-intestinal infections in poultry, called colibacillose, and cause great economic losses to the poultry industry. The aim of this work was to examine APEC strains, isolated from avian cellulitis and colisepticemic chickens from South Brazil, for antibiotic resistance, presence of virulence-associated genes (VAGs), phylogenetic typing and phylogenetic analyses.

In poultry, antibiotics are routinely used to prevent infection and promote growth. We analyzed the susceptibility to 15 antibiotics in 144 *E. coli* isolates collected from cellulitis lesions and in 41 isolates from septicemic chickens. APEC isolates have shown low levels of resistance excepting tetracycline and sulphonamides, and colisepticemic isolates were resistant to antibiotics that act in the cell wall, such as ampicillin, cephalotin, ceftiofur and bacitracin.

The virulence factors most frequently associated with APEC pathogenicity are the adhesins F1 and Tsh (Temperature sensitive hemagglutinin), the iron acquisition system aerobactin, the protein Iss (increased serum survival), K1 capsule and production of colicin V. To investigate the presence of VAGs in the isolates, we performed multiplex polymerase chain reactions to test 33 virulence factors. Virulence factors related to adhesion, iron acquisition and serum resistance were present in almost all strains. The factors *fimC*, *ompA*, *crlA* and *traT* were the most frequent in APEC isolates.

The phylogenetic typing were done using the Clermont *et al.* (2000) method, which classifies *E. coli* strains into four main phylogenetic groups (A, B1, B2, and D). Our phylogenetic typing has shown that cellulitis and colissepticemic isolates were more related to group D.

Amplified ribosomal restriction analysis (ARDRA) was performed in colissepticemic and cellulitis isolates from broiler chickens from Southern Brasil. The similarity among isolates were observed with a dendrogram based on the band pattern. Our results have shown that clones of cellulitis and colissepticemic isolates could not be distinguished and there is no endemic clones in regions observed analysed.

The results of the present work give us a panorama of the susceptibility to antibiotics, virulence factors, phylogenetic typing and phylogenetic analyses currently found in APEC isolates from severe lesions of cellulites and colibacillosis in south Brazil. Besides that, these analyses could be helpful for monitoring and preventing outbreaks of colibacillosis. Controlling the first stages of the disease and detecting more prevalent clones in this region may reduce the incidence of the disease.

**Key-words:** avian pathogenic *Escherichia coli*; APEC; colibacillosis; antibiotic susceptibility; virulence factors; phylogenetic grouping; ARDRA

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 <i>Escherichia coli</i> patogênica aviária (APEC).....	15
1.2 Produção avícola no Brasil.....	17
1.3 Patogenia e sintomas da colibacilose.....	19
1.3.1 Colissepticemia.....	19
1.3.2 Celulite aviária.....	21
1.4 Tratamento.....	23
1.4.1 Antimicrobianos mais usados.....	24
1.5 Fatores associados à virulência.....	25
1.5.1 Adesinas.....	26
1.5.2 Invasinas.....	29
1.5.3 Resistência ao soro.....	30
1.5.4 Sistemas de aquisição de ferro.....	31
1.5.5 Toxinas.....	33
1.5.6 Outros fatores de virulência.....	33
2. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 Cepas bacterianas utilizadas.....	36
3.2 Métodos de identificação.....	38
3.3 Método de difusão com disco Kirby e Bauer.....	39
3.4 Extração de DNA.....	39
3.5 Reação da polimerase em cadeia multiplex.....	40
3.6 Tipagem filogenética.....	43
3.7 Análise filogenética.....	43
3.8 Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos.....	45
4.2 Prevalência dos fatores associados à virulência.....	50
4.3 Tipagem filogenética.....	56
4.4 Análise filogenética.....	59
5. DISCUSSÃO.....	66



5.1 Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos.....	66
5.2 Prevalência dos fatores associados à virulência.....	69
5.3 Tipagem filogenética.....	72
5.4 Análise filogenética.....	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
6.1 Principais conclusões.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
CURRICULUM VITAE.....	89
ANEXOS.....	94

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura. 1.</b> Produção avícola brasileira em 2008.....	18
<b>Figura. 2.</b> Suscetibilidade a 15 agentes antimicrobianos.....	47
<b>Figura. 3.</b> Padrão de multi-ressistência dos isolados de APEC.....	48
<b>Figura. 4.</b> Produtos de amplificação do PCR multiplex.....	51
<b>Figura. 5.</b> Padrão de fatores associados à virulência.....	54
<b>Figura. 6.</b> Associação entre 33 fatores associados à virulência entre isolados de Celulite e Colisepsicemia.....	55
<b>Figura. 7.</b> Padrão de digestão das enzimas de restrição.....	62
<b>Figura. 8.</b> Dendrograma mostrando a relação filogenética entre os 41 Isolados de Colisepsicemia.....	63
<b>Figura. 9.</b> Dendrograma mostrando a relação filogenética entre os 90 Isolados de Celulite.....	64
<b>Figura. 10.</b> Dendrograma mostrando a relação filogenética entre os 90 Isolados de Celulite e 41 isolados de Colisepsicemia.....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Cepas padrão para a Reação multiplex.....	37
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos usados para a detecção de genes associados à virulência em cepas APEC.....	41
<b>Tabela 3.</b> Resistência aos agentes antimicrobianos em isolados de Celulite e de Colissepticemia.....	49
<b>Tabela 4.</b> Prevalência dos fatores associados à virulência em isolados de Celulite Colissepticemia e APEC.....	52
<b>Tabela 5.</b> Análise do grupamento filogenético ECOR em isolados de Celulite e Colissepticemia.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>afa</i>	gene da adesina afimbriada
AFEC	<i>Escherichia coli</i> comensal aviária
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária
ARDRA	análise de restrição de DNA ribossômico amplificado
ATP	adenosina trifosfatada
BHI	meio infusão cérebro-coração ( <i>brain infusior heart broth</i> )
<i>chuA</i>	gene receptor de heme ( <i>Heme receptor gene - E. coli haem utilization</i> )
<i>cnf 1/2</i>	gene dofator citotóxico necrotizante
ColV	plasmídeo de Colicina V
<i>curl</i>	curli (Curli fiber gene)
<i>cvi/cva</i>	gene que codifica a Colicina V
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleosídeos trifosfatados
<i>dra</i>	gene da adesina Dr ( <i>Dr antigen-specific adhesin</i> )
EAST1	citotoxina estável ao aquecimento ( <i>heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative E. coli</i> )
ECOR	tipagem filogenética de <i>Escherichia coli</i>
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
Ex-PEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extra-intestinal
F1	fímbria tipo 1
<i>fyuA</i>	gene do receptor da captação de ferro ( <i>Ferric yersinia uptake - yersinia-bactin receptor</i> )
<i>gimB</i>	ilha de patogenicidade associada a NMEC ( <i>Genetic island associated with newborn meningitis</i> )
HEp-2	linhagem de células epiteliais humanas
HK-2	linhagem de células epiteliais do tubo proximal humano
<i>hlyA</i>	gene da hemolisina A
<i>hra</i>	gene da adesina de aglutinação resistente à temperatura
<i>ibeA</i>	gene da invasina do endotélio cerebral
<i>iha</i>	adesina regulada pelo ferro ( <i>Iron-regulated-gene-homologue adhesion</i> )
<i>ireA</i>	gene do elemento responsável ao ferro
<i>iro</i>	genes da Salmoquelina
<i>irp2</i>	gene da proteína repressível por ferro ( <i>Iron repressible protein yersinia-bactin synthesis</i> )
ISR	região do espaçamento intergênico do DNA ribossômico na região 16S-23S
<i>iss</i>	gene do aumento da resistência ao soro (increased serum survival)
<i>iuc / iut</i>	genes da Aerobactina
<i>kpsMT II</i>	gene da cápsula II ( <i>Group II capsule antigens</i> )
LB-ágar	ágar Luria Bertani
LPS	lipopolissacarídeo
<i>malX</i>	ilha de patogenicidade ( <i>Pathogenicity-associated island marker</i> )
<i>mat</i>	gene da fímbria associada à meningite (meningitis associated and temperature regulated fimbriae)
MLEE	eletroforese de enzimas multilocus
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
<i>neuC</i>	gene da cápsula K1 (K1 capsular polysaccharide)
NMEC	<i>Escherichia coli</i> causadora da meningite do recém-nascido
<i>ompA</i>	gene da proteína de membrana externa ( <i>Outer membrane protein</i> )
<i>pap</i>	gene do pilus associado à pielonefrite
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PFGE	eletroforese de campo pulsado
PIB	produto interno bruto
<i>pic</i>	gene do autotransportador serina-protease
RAPD	amplificação aleatória de DNA polifórmico
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	ácido ribonucléico ribossômico
<i>sat</i>	gene da toxina secretada ( <i>secreted autotransporter toxin</i> )
<i>sfa/focCD</i>	gene da fímbria específica ao ácido siálico ( <i>S fimbriae sialic acid-specific and F1C fimbriae</i> )
<i>sitABCD</i>	genes do sistema de transporte de ferro
STM	mutagênese marcada por assinatura
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
<i>tia</i>	invasina toxigênica ( <i>toxigenic invasion locus in ETEC strains</i> )
<i>traT</i>	genes da proteína de transferência ( <i>TransferProtein</i> )
tRNA	ácido ribonucléico transportador
<i>tsh</i>	gene da hemaglutinina sensível à temperatura
TSI	meio três açúcares e ferro
UFC	unidade formadora de colônia
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
UPGMA	método de análise de grupos não pareados
VAGs	fatores associados à virulência
<i>vat</i>	gene da toxina vacuolizante ( <i>vacuolating autotransporter toxin</i> )
VERO	linhagem celular derivada do rim do macaco verde

## 1. INTRODUÇÃO

Há poucos microrganismos tão versáteis quanto a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, descrita pela primeira vez em 1885 por Theodor von Escherich. Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, *E. coli* é um anaeróbico facultativo, em forma de bastonete curto e de distribuição cosmopolita. É um importante membro da flora intestinal normal da maioria dos animais, sendo que a colonização bacteriana do intestino ocorre logo após o nascimento (Barnes & Gross, 1997; Ferreira & Knöbl, 2000; Kaper *et al.*, 2004).

*E. coli* foi considerada por muito tempo uma bactéria não-patogênica, pois faz parte da microbiota entérica e auxilia na prevenção da colonização do epitélio por microrganismos patogênicos. Contudo, vários clones de *E. coli* têm adquirido fatores de virulência específicos que conferem habilidades para a adaptação em novos nichos, permitindo-lhes causar vários tipos de infecções e um amplo espectro de doenças, tanto em humanos quanto em outros animais (Barnes & Gross, 1997; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Ferreira & Knöbl, 2000; Kaper *et al.*, 2004). *E. coli* é a bactéria mais bem conhecida e uma das mais isoladas em laboratórios clínicos de microbiologia, devido a sua grande importância biológica (Russo & Johnson, 2000).

Os fatores de virulência que conferem à bactéria habilidade de causar doenças são encontrados em elementos genéticos que podem estar presentes em diferentes combinações. Somente cepas com persistentes e importantes combinações de tais fatores de virulência causam doença em indivíduos saudáveis (Kaper *et al.*, 2004). De uma maneira geral, esses fatores de virulência devem prioritariamente permitir que (1) a bactéria se adapte e colonize eficientemente novos nichos no hospedeiro, (2) sobreviva e se multiplique no hospedeiro, (3) escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro, e, finalmente, (4) saia do hospedeiro para a transmissão para um novo hospedeiro suscetível, o que, em alguns casos, significa possuir aparatos para sobreviver em um ambiente externo antes de encontrar o novo hospedeiro (Falkow, 1991).

As *E. coli* podem ser agrupadas filogeneticamente de acordo com a sua proximidade genética. Através de mutações que ocorreram ao longo da evolução e que se mantiveram nas populações bacterianas, foi possível agrupar as cepas de *E. coli* em 4 grupos: A, B1, B2 e D (Clermont *et al.*, 2000).

Além da classificação filogenética, *E. coli* podem ser divididas em três grandes grupos, de acordo com: a presença de genes de virulência, a sintomatologia clínica ou com o

local onde foi isolada. O primeiro grupo é constituído das cepas de *E. coli* comensais, que estão presentes na microbiota normal de humanos, mamíferos e aves saudáveis, e que coexistem pacificamente com o seu hospedeiro. A maioria das cepas desse grupo pertencem ao grupo filogenético A. O segundo grupo é constituído pelas cepas de *E. coli* enteropatógenicas, raramente encontradas na microbiota normal de animais saudáveis, que causam gastroenterites e colites quando ingeridas em quantidades suficientes. A maioria das cepas desse grupo pertencem aos grupos filogenéticos A, B1 e D. O terceiro e último grupo é constituído pelas cepas de *E. coli* que causam infecções extra-intestinais (Ex-PEC, *E. coli* patogênica extra-intestinal), são comuns a todas faixas etárias, órgãos ou sítios anatómicos, e normalmente pertencentes aos grupos filogenéticos B2 e D (Russo & Johnson, 2000).

*E. coli* extra-intestinais podem colonizar o trato intestinal, estando presentes em aproximadamente 20 % dos seus hospedeiros humanos. No entanto, para causarem a doença, não basta somente a aquisição da cepa pelo hospedeiro, esta precisa ser capaz de infectar um sítio extra-intestinal (Russo & Johnson, 2000). Dessa forma, Ex-PEC podem ser a causa da maior parte das infecções no trato urinário (UPEC, “*uropathogenic E. coli*”), meningite do recém-nascido (NMEC, “*new born meningitis-causing*”) e doenças aviárias (APEC, “*avian pathogenic E. coli*”).

O perfil de virulência de *E. coli* extra-intestinais é muito diverso, sugerindo que existam múltiplas soluções para o desafio de ser um patógeno bem sucedido. Apesar disso, cepas que causam infecções em diferentes sítios extra-intestinais em diferentes hospedeiros tendem a possuir fatores de virulência similares. Isso não é tão surpreendente, visto que, isolados Ex-PEC precisam resistir a mecanismos de defesa dos hospedeiros que são comuns a vários sítios extra-intestinais (Russo & Johnson, 2000).

Para ser um patógeno eficiente, *E. coli* possui fatores de virulência relacionados às várias etapas da infecção, como adesinas, invasinas, toxinas, sistemas de aquisição de ferro e resistência ao soro (Kaper *et al.*, 2004).

### **1.1 Escherichia coli Patogênica Aviária (APEC)**

*E. coli* patogênicas aviárias são a causa de doenças extra-intestinais em aves, que se manifestam na forma de doenças localizadas ou infecções sistêmicas, denominadas co-

libacilose. A colibacilose é uma doença que está disseminada pelo mundo inteiro (Ferreira & Knöbl, 2000).

APEC podem estar na microbiota intestinal de aves saudáveis, podendo assim, permanecer nas criações por um longo período, contaminando os alimentos e a água, que servirão como via de disseminação da bactéria para as aves. Acredita-se que a contaminação fecal da casca do ovo é uma das vias de transmissão da doença para os pintos (Ewerset *et al.*, 2009).

O diagnóstico da doença se dá a partir do isolamento de *E. coli* provenientes de lesões presumivelmente de colibacilose (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999). O isolamento de *E. coli* deve ser realizado em meio apropriado, como o ágar MacConkey, seletivo para Gram-negativas, e confirmado com os testes de identificação bioquímicos (Barnes & Gross, 1997; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Ferreira & Knöbl, 2000). As colônias de *E. coli* isoladas das aves possuem características morfológicas similares às das isoladas de outras fontes, como humanos (Barnes & Gross, 1997). As colônias formadas em meios de cultivo sólido são lisas, convexas, brilhantes e com bordas regulares (Ferreira & Knöbl, 2000).

A estrutura antigênica que contribui para a determinação dos sorogrupos de *E. coli* é baseada na identificação dos antígenos somáticos (O, *Öhne*), capsulares (K, *Kapsel*), flagelares (H, *Hauch*) e fimbriais (F, *Fimbriae*). Atualmente, são descritos para bactérias gram-negativas mais de 180 antígenos somáticos, 100 antígenos capsulares e 50 antígenos flagelares. Existem amostras auto-aglutinantes, que não podem ser sorotipadas devido à perda parcial ou total da cadeia do polissacarídeo (Ferreira & Knöbl, 2000). Os sorogrupos de APEC mais comumente encontrados mundialmente são dos tipos O1, O2, O8, O35 e O78 (La Ragione & Woodward, 2002), enquanto que no Brasil os sorogrupos de APEC mais frequentes são O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119 e O152 (Ferreira & Knöbl, 2000;).

A disponibilidade do primeiro genoma de APEC (APEC O1:K1:H7) (Johnson *et al.*, 2007) e de 3 plasmídeos sequenciados (Johnson *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; Mellata *et al.*, 2009) auxiliam no estudo da APEC. A partir desses dados, pode-se obter melhor conhecimento da doença através da aplicação de genética molecular, visando definir o patótipo e o grau de virulência dos isolados. Além disso, novas ferramentas de sequenciamento, expressão e identificação de fatores de virulência de APEC em modelos de infecção são uma oportunidade de melhorar o conhecimento sobre os mecanismos de virulência (Dziva & Stevens, 2008).



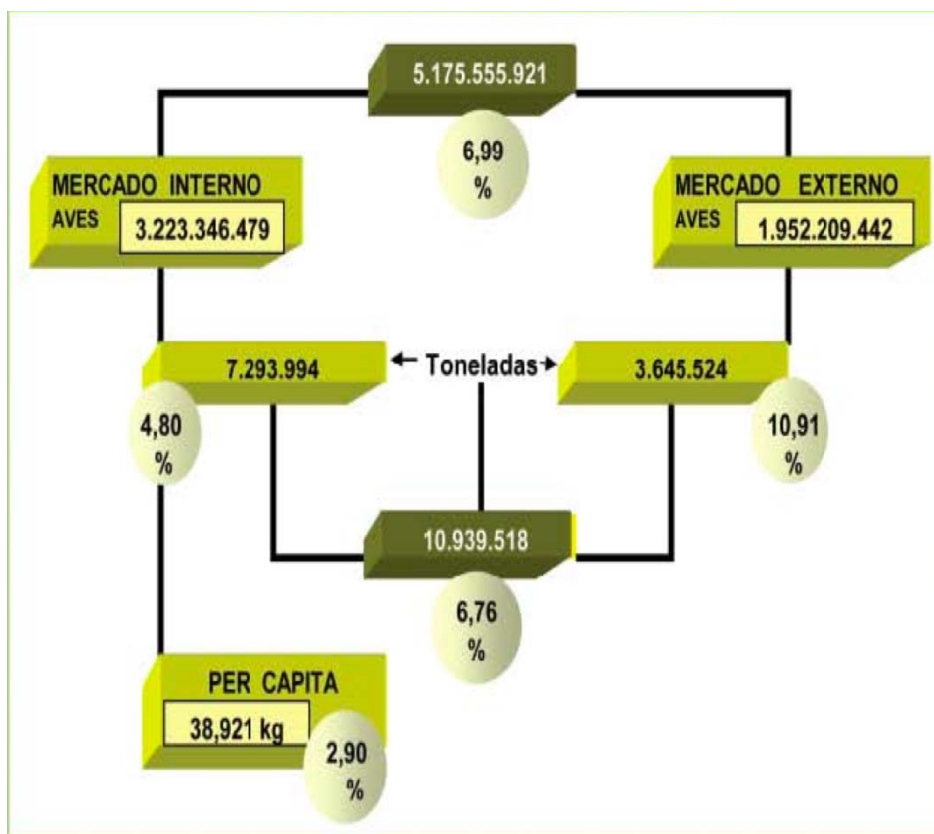
## **1.2 Produção Avícola no Brasil**

O agronegócio é uma das principais fontes econômicas do Brasil, sendo responsável por 33 % do Produto Interno Bruto (PIB), 42 % das exportações totais e 37 % dos empregos brasileiros (Brasil, 2010).

A produção brasileira de carne de frango em 2008 foi de 5,17 bilhões de cabeças (Fig. 1), correspondendo a 10,94 milhões de toneladas, resultado que manteve o país no terceiro lugar entre os maiores produtores mundiais, atrás somente dos Estados Unidos e da China. O Brasil teve participação de 42 % nas vendas no mercado internacional, mantendo sua posição de maior exportador mundial de carne de frango, sendo líder absoluto desde 2004, tendo como maiores mercados o Oriente Médio e a Ásia. Os estados da região Sul respondem por mais da metade (55%) da produção nacional de frangos de corte e também são os que mais exportam carne de frango (74,9% do total exportado). A receita cambial anual gerada pela exportação de carne de frango (3,64 milhões de toneladas, em 2008) é de aproximadamente sete bilhões de dólares (UBA, 2008/2009).

De acordo com a normativa nº 210 de 10 de novembro de 1998 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1998), qualquer órgão ou partes da carcaça que estiverem afetados por um processo inflamatório, como é o caso da celulite, deverá ser retirado e, caso exista evidência de caráter sistêmico da patologia, como na colissepticemia, a carcaça e as vísceras deverão ser condenadas. A partir disso, no Rio Grande do Sul, os relatos de condenações por colibacilose em agroindústrias foram de 0,041 % em 2004 (UBA, 2004/2005), o que corresponde a uma perda anual de 2,9 milhões de dólares.

A prevalência da colibacilose, nas suas várias formas, e o prejuízo que causa à avicultura brasileira justificam o investimento na pesquisa científica que investiga o agente etiológico da colibacilose (APEC) e como a infecção se estabelece na ave. Esse conhecimento é fundamental na orientação de novas estratégias de controle das infecções por APEC nos aviários (Brito *et al.*, 2002; Fallavena *et al.*, 2000).



**Figura 1.** *Produção brasileira de aves de corte em 2008.* Os números em círculos indicam a variação percentual sobre o ano anterior. O per capita foi estimado considerando a população brasileira de 187 milhões de habitantes.

Fonte UBA, 2008/2009

### **1.3 Patogenia e sintomas da colibacilose**

Colibacilose aviária se refere a qualquer infecção, localizada ou sistêmica, causada total ou parcialmente por *E. coli* em diferentes espécies de aves. É observada principalmente em galinhas, perus e patos, e menos frequentemente em outras espécies de aves, como gansos, pássaros domésticos e aves silvestres (Barnes & Gross, 1997; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

A colibacilose afeta todas as etapas da produção de aves comerciais, contribuindo para a diminuição da qualidade da produção. Aves acometidas desenvolvem lesões em diferentes órgãos, como fígado, coração, sacos aéreos, pulmões, articulações e tecidos subcutâneos, o que pode causar a condenação da carcaça ou a disseminação da doença por toda criação (Ferreira & Knöbl, 2000).

As perdas econômicas ocorrem devido à morbidade (com perda de peso, redução do crescimento e da produção de ovos), ao aumento da condenação das carcaças durante o processamento e ao aumento da mortalidade (Barnes & Gross, 1997; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

A colibacilose afeta aves jovens, de 4 a 9 semanas, pois nessa idade as aves são mais suscetíveis a problemas respiratórios; já em aves adultas, a enfermidade está mais relacionada a quadros de salpingites (infecção no oviduto) e infecções sistêmicas (Ferreira & Knöbl, 2000; Cardoso *et al.*, 2002). Os sintomas mais evidentes nas aves doentes são depressão e febre, que podem ser seguidos de morte (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

#### **1.3.1 Colissepticemia**

A infecção sistêmica, causada por *E. coli* é denominada colissepticemia (Barnes & Gross, 1997). A doença pode instalar-se em diferentes sítios anatômicos da ave e apresentar sintomatologia variada (Ngeleka *et al.*, 1996; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

A colibacilose, quando iniciada no trato respiratório superior, ocorre provavelmente devido à inalação de poeira contaminada. Fatores externos ao animal, considerados ambientais, como altas concentrações de amônia no ambiente, predispõe à doença pelo fato de

causar danos no epitélio ciliar do trato respiratório, facilitando a entrada da bactéria. A deficiência no sistema de ventilação, a exposição a temperaturas superiores a 25° C, a limitação do espaço para a criação e a deficiência no processo de desinfecção também contribuem para a infecção das aves por APEC e para o estabelecimento da doença, pois oferecem à bactéria um ambiente mais propício ao seu desenvolvimento (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Ferreira & Knöbl, 2000).

Além disso, a existência de infecções por outros agentes, como *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus paragallinarum*, Pneumovírus, vírus da Bronquite Infecciosa, doença de Marek e de New Castle, bem como a presença de micotoxinas na ração podem deixar a ave pré-disposta à infecção por APEC. De modo geral, qualquer fator que possa lesionar o epitélio respiratório, inclusive vacinas com vírus atenuado, pode tornar a ave mais suscetível à doença (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Ferreira & Knöbl, 2000; Dwars *et al.*, 2009).

Dependendo dos fatores de virulência dos isolados e da suscetibilidade da ave, a infecção pode se manifestar primeiramente como uma septicemia que posteriormente pode causar morte ou inflamação disseminada em múltiplos órgãos. As lesões mais comuns são peri-hepatite, aerossaculite, pericardite, embora outras síndromes como peritonites, salpingites, onfalite e osteomielite possam ser observadas (Dziva & Stevens, 2008).

Após a colonização dos pulmões e sacos aéreos da ave pela bactéria, observa-se o espessamento do epitélio e a presença frequente de um exudato caseoso na superfície do trato respiratório. Microscopicamente, as primeiras mudanças são edemas e infiltrado de heterófilos. Fagócitos mononucleares são frequentemente encontrados 12 h após a infecção. Após, as células fagocitárias se tornam células gigantes, comumente encontradas pelas margens das áreas necróticas e ocorre a proliferação de fibroblastos e acumulação de heterófilos necróticos no exudato caseoso. As lesões de doenças respiratórias são identificadas por aumento dos folículos linfóides, hiperplasia epitelial e presença de heterófilos nos epitélios aéreos (Barnes & Gross, 1997; Ferreira & Knöbl, 2000).

A infecção sistêmica pode ser reproduzida através da inoculação da bactéria nos sacos aéreos ou intra-traquéia. Aerossaculites ocorrem em 1 h 30 min após a infecção; bacteremia e pericardite se desenvolvem em 6 h. Em aves que sobrevivem, lesões bem desenvolvidas podem ser observadas em 48 h após a inoculação. A maior parte da mortalidade ocorre dentro de cinco dias. As aves que sobrevivem à infecção apresentam recuperação rápida (Barnes & Gross, 1997).

### 1.3.2 Celulite aviária

A celulite aviária, também conhecida como dermatite necrótica, foi primeiramente descrita por Randall *et al.*, em 1984, na Inglaterra. É uma causa importante de perdas econômicas. Mesmo que não ocorram sinais clínicos evidentes ou mortalidade (Norton, 1997), o impacto econômico da celulite está, sobretudo, na condenação parcial ou completa das carcaças e na redução da velocidade do processamento nos abatedouros para se remover as carcaças afetadas (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Singer *et al.*, 1999; Ferreira & Knöbl, 2000). A celulite é uma das principais causas de condenação das carcaças na avicultura (Peighambari *et al.*, 1995; Gomis *et al.*, 1997a).

A doença é caracterizada por uma reação inflamatória difusa no tecido subcutâneo que pode se estender ao tecido muscular, frequentemente associada à formação de abscessos nas aves. A região mais afetada, respondendo por 92 % das lesões observadas, é a abdominal, geralmente entre a coxa e linha mediana do corpo (Gomiset *al.*, 1997b; Norton, 1997).

Devido à dificuldade de se perceber as lesões nas aves em bandos, por afetarem a pele que está coberta pelas penas, e à ausência de sinais clínicos, as lesões só são observadas no processamento (Gomiset *al.*, 1997b; Norton, 1997; Singer *et al.*, 2001).

*E. coli* é a bactéria mais encontrada nas lesões de celulite, estando presente em aproximadamente 90 % das amostras e sendo a única bactéria presente em 60 % dos casos. Também são encontradas nas lesões, porém em menores porcentagens, *Streptococcus dysgalactiae*, *Proteus spp.*, *Aeromonas spp.* e *Citrobacter freundii* (Gomiset *al.*, 1997a; Norton, 1997).

As lesões provocadas por *E. coli* podem variar bastante na sua aparência morfológica, desde um moderado exudato heterolítico fibroso bem definido até placas fribrinocaseosas que podem também apresentar granulomas. Nas análises histopatológicas, podem ser encontradas debris de células que sofreram necrose e células inflamatórias, como células gigantes polinucleadas, heterófilos, linfócitos e macrófagos. O tamanho da lesão é variável, podendo possuir de 1 a 10 centímetros de diâmetro, e a sua coloração pode ser desde um amarelo claro até um amarelo-ouro ou amarelo-amarronzado acompanhado de hemorragia (Peighambari *et al.*, 1995; Fallavena *et al.*, 2000; Singer *et al.*, 2001).

A baixa qualidade do criadouro e a qualidade da linhagem das aves são fatores que possivelmente contribuam para a celulite aviária (Barnes & Gross, 1997), assim como a

densidade dos criadouros cujo aumento propicia que as aves lesionem umas às outras, que são a porta de entrada da bactéria, já que a infecção não se estabelece na pele intacta (Norton *et al.*, 1997;1999; Fallavena *et al.*, 2000). Ademais, as chances de tais lesões ocorrerem é aumentada pela seleção de aves de alta conversão alimentar e do uso de promotores de crescimento, que não apresentam a proporcional cobertura de penas (Peighambari *et al.*, 1995 e Norton *et al.*, 1999). Na década de 30, o frango demorava 15 semanas para ser abatido, com um peso médio de 1,5 kg, ao passo que hoje os frangos são abatidos em média com 6 semanas (43 dias), tendo um peso de 2,34 kg (Norton, 1997; UBA, 2006/2007).

As cepas APEC originárias de lesões de celulite são extremamente diversas em relação aos sorogrupos, à suscetibilidade aos antimicrobianos e ao perfil dos fatores de virulência (Singer *et al.*, 1999). Os sorogrupos mais encontrados em lesões de celulite são os mesmos encontrados em colissepticemia, como o O1, O2 e O78, embora 33 % das amostras não sejam sorotipáveis (Norton, 1997 e Norton *et al.*, 1999).

As lesões de celulite podem ser reproduzidas experimentalmente através de arranhões na pele e subsequente inoculação da bactéria (com swab) ou através de inoculações subcutâneas, que desenvolvem lesões de celulite em 86 % ou 100 % das aves inoculadas, respectivamente. Após 18 h da inoculação, as primeiras evidências das lesões já podem ser observadas (Norton *et al.*, 1997;1999). Também são observadas pericardites, aerosaculites, perihepatites e osteomielites entre 1 e 6 dias após a inoculação, sendo que 30 % das aves desenvolvem septicemia e morrem. As aves em que são detectadas lesões de celulite, 14 dias após a inoculação apresentam uma redução significativa no ganho de peso se comparado com o grupo controle (Gomis *et al.*, 1997b). A mortalidade cresce à medida que cresce a dose bacteriana inoculada na lesão (Norton *et al.*, 1997).

*E. coli* se mantém nas criações após sucessivos lotes, por um longo período, mesmo com a troca total ou parcial da cama, possivelmente devido a sua permanência na poeira e em equipamentos presentes nas criações. Por isso, diferentes criadouros de uma mesma fazenda podem apresentar populações similares de *E. coli* associadas à celulite (Singer *et al.*, 2000).

## 1.4 Tratamento da Colibacilose

O tratamento da colibacilose é realizado com agentes antimicrobianos, e o sucesso do tratamento é maior quando a administração do medicamento é feita na fase inicial da doença. Os antibióticos usados mais frequentemente são quinolonas, macrolídeos, aminoglicosídeos, betalactâmicos, tetraciclinas e sulfonamidas (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

Uma das principais limitações do tratamento é a crescente resistência aos antimicrobianos desenvolvidas por cepas de *E. coli* (Johnson *et al.*, 2005b) devido ao uso indiscriminado, prolongado, em concentrações sub-terapêuticas e com indicações terapêuticas inadequadas dos agentes antimicrobianos. Por causa disso, testes de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos deveriam ser realizados periodicamente em *E. coli* isoladas de lesões de colibacilose nos criadouros, a fim de se escolherem os melhores e mais eficientes agentes antimicrobianos para o tratamento do lote (Barnes & Gross, 1997; Ferreira & Knöbl, 2000).

Outra limitação é o fato de existirem poucas maneiras de tratar APEC além do emprego de antimicrobianos, mesmo que estes apresentem custo elevado e sejam administrados a todas as aves do bando, inclusive às aparentemente saudáveis. A administração de antimicrobianos a todo o lote ocorre pela dificuldade de analisar a doença nos seus primeiros estágios nas aves em grandes grupos (Ferreira & Knöbl, 2000).

Essas limitações justificam o desenvolvimento de esquemas de prevenção e estratégias sem o uso de antimicrobianos. Além do mais, as exportações de carne de frangos do Brasil vêm sofrendo com barreiras sanitárias que proíbem do uso de agentes antimicrobianos na criação de frangos de corte (Barnes & Gross, 1997; Ferreira & Knöbl, 2000).

Devido ao impacto clínico e econômico das infecções por *E. coli*, existem muitas razões para ocorrerem novas pesquisas de epidemiologia molecular. O conhecimento de mais características de fatores de virulência das Ex-PEC, envolvidas em bacteremia, pode ser usado para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas, como vacinas inativadas contra *E. coli*. As vacinas atualmente existentes no mercado são baseadas no sorotipo, e por isso são pouco usadas por serem ineficientes, já que há uma grande variedade de sorogrupos entre as APEC (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

A prevenção contra a colibacilose baseia-se principalmente em medidas inespecíficas de manejo, pois a ocorrência da doença apresenta aspectos multifatoriais relacionados à higiene geral de criação, manejo, clima e nutrição das aves. Por isso, a ocorrência da co-

libacilose pode ser diminuída com o controle da contaminação do meio ambiente, monitorando parâmetros como umidade da cama, ventilação, poeira, concentração de amônia no ar, temperatura, densidade de aves e eficiência no processo de desinfecção (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Ferreira & Knöbl, 2000).

O uso de bebedouros do tipo bico (Niple) e o aumento dos intervalos de tempo entre os lotes têm se mostrado eficientes na redução de doenças respiratórias. A utilização de probióticos e produtos de exclusão competitiva podem auxiliar na eliminação de amostras de *E. coli* patogênica do sistema digestivo das aves. Melhorias no estado imunológico correlacionadas aos níveis das vitaminas A, C, D e E e também à adição de outras substâncias imunorreguladoras na ração e na água de beber também podem contribuir na prevenção das doenças (Barnes & Gross, 1997; Ferreira & Knöbl, 2000).

#### *1.4.1 Antimicrobianos mais usados no tratamento*

O uso de antimicrobianos na produção animal pode afetar a saúde humana pela presença de resíduos de medicamentos e de bactérias resistentes nos alimentos derivados desses animais. Como consequência, há risco de transferência de patógenos resistentes de animais para humanos e posterior transferência horizontal dos genes de resistência à microbiota humana (Van den Bogaard *et al.*, 1996; 2000).

O uso de agentes antimicrobianos é a principal forma de controlar a morbidade e mortalidade causadas por APEC associadas à colibacilose aviária. Não há ainda um consenso de quando ou como a administração de antibióticos em animais afeta o desenvolvimento e disseminação da resistência a agentes antimicrobianos para patógenos bacterianos humanos (Lee & Maurer, 2000). No entanto, o uso prudente dos agentes antimicrobianos se faz necessário para preservar os fármacos administrados tanto em animais quanto em humanos (Gyles, 2008).

Os agentes antimicrobianos também podem ser utilizados para a promoção do crescimento e prevenção de doenças. Nessas situações, são administradas doses inferiores às recomendadas para o tratamento da doença, o que aumenta as chances de transferência de resistência e de mutações que podem gerar isolados resistentes (Singer & Hofacre,



2006). São exemplos de promotores de crescimento a bacitracina e a tetraciclina, ambos testados neste trabalho.

Os agentes antimicrobianos disponíveis para tratar infecções do trato respiratório causadas por APEC são limitados. O valor comercial de cada ave é muito baixo, tornando inviável a utilização de doses individuais de antimicrobianos, como aminoglicosídeos e cefalosporinas (Singer & Hofacre, 2006).

Devido ao fato de que animais doentes, apesar de não se alimentarem, continuam bebendo água, os agentes antimicrobianos que podem ser dissolvidos na água são os mais utilizados. Já que a bacitracina e a neomicina não são bem absorvidas no trato gastrintestinal, os fármacos disponíveis para o tratamento da colibacilose são as fluorquinolonas, as tetraciclinas e as sulfonamidas. Tal limitação na disponibilidade de agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções por *E. coli* pode ter resultado em uma forte pressão seletiva na indústria aviária, e, conseqüentemente, em altos níveis de resistência a sulfonamidas e tetraciclina em isolados clínicos de APEC (Singer & Hofacre, 2006).

Os antibióticos testados neste trabalho foram selecionados com base na maior utilização, na indústria aviária brasileira, para promoção do crescimento, tratamento e profilaxia da colibacilose. Foi selecionado pelo menos um membro de cada uma das classes de antimicrobianos mais usados.

### **1.5 Fatores associados à virulência**

Vários fatores de virulência têm sido investigados em cepas APEC isoladas de aves com colissepticemia. Os fatores mais frequentemente associados à patogenicidade incluem as fímbrias de aderência F1 e Tsh (hemaglutinina sensível à temperatura); o sistema sideróforo aerobactina, que habilita a captura de  $Fe^{3+}$  pela bactéria em tecidos pobres neste íon; a proteína Iss (*increased serum survival*), supostamente envolvida na resistência ao efeito bactericida do soro; a cápsula K e a produção de colicina V (Dozois *et al.*, 2000; Delicato *et al.*, 2003; Ewerset *et al.*, 2004; Moulin-Schouleur *et al.*, 2006).

No entanto, cepas APEC podem carecer de um ou mais dos fatores de virulência e ainda assim serem patogênicas. Excetuando a fímbria F1, encontrada na grande maioria das cepas de *E. coli*, os genes que codificam fatores associados à virulência em geral estão

ausentes nos genomas de cepas não-virulentas de *E. coli* (Dozois *et al.*, 2003), sendo frequentemente encontrados em plasmídeos (sobretudo plasmídeos ColV) ou bacteriófagos (Ginnset *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002; Tivendale *et al.*, 2004; Skyberg *et al.*, 2006). Cepas APEC distintas geneticamente podem produzir a mesma infecção, pois podem apresentar fatores de virulência que, apesar de diferentes, possuem a mesma função e atuam no mesmo sítio do hospedeiro (Finlay e Falkow, 1997). Dessa forma, parecem existir estratégias comuns que tornam a bactéria um patógeno eficiente.

Os fatores de virulência já descritos para APEC serão comentados a seguir.

### 1.5.1 Adesinas

A aderência ao hospedeiro é um passo importante para a colonização e ocorre nos primeiros momentos da interação da bactéria com o hospedeiro. *E. coli* possuem fatores de adesão específicos, o que lhes permitem colonizar sítios em seu hospedeiro que normalmente não habitariam (Kaperet *et al.*, 2004). Na infecção por *E. coli*, a colonização de múltiplos órgãos ocorre em aves que sobrevivem à septicemia inicial. Em função disso, a expressão de adesinas pode regular a preferência por colonizar diferentes órgãos durante a infecção (Stordeur *et al.* 2002), tendo sido demonstrado que isolados de celulite aviária aderem fracamente na superfície da pele, mas fortemente às camadas mais profundas da derme do seu hospedeiro (Leclerc *et al.*, 2003).

As estruturas que permitem a adesão da bactéria ao hospedeiro, podem ser fimbriadas ou afimbriada. Na maioria das vezes, as adesinas formam estruturas morfolologicamente distintas, chamadas fímbrias ou pili. A adesão ao hospedeiro, também pode ser realizada por proteínas da membrana externa da bactéria. Nem todas as adesinas são fatores de virulência, pois bactérias não-patogênicas também podem possuir adesinas para se fixar nas mucosas do trato-gastrointestinal e nem por isso causam danos ao hospedeiro (Vidotto *et al.*, 1997; La Ragione & Woodward, 2002).

As adesinas fimbriadas são filamentos proteínáceos expressos na superfície bacteriana que medeiam a adesão às células do hospedeiro. Uma bactéria pode apresentar mais de 400 estruturas fimbriadas na sua superfície (Dziva & Stevens, 2008; Antão *et al.*, 2009).

A fímbria do tipo 1 (F1), primeira estrutura fimbrial identificada, é a adesina mais comum em bactérias gram-negativas, sendo encontrada entre 70 a 100 % dos isolados APEC (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Antão *et al.*, 2009). A fímbria F1 é codificada pelo operon fim (*Type 1 fimbriae D-mannose specific adhesin*), que codifica um filamento de 1 a 2 µm de comprimento presente na superfície bacteriana, composto por várias subunidades. Na extremidade mais externa da fímbria é encontrada uma lectina (FimH) que reconhece a manose e promove a aderência e colonização bacteriana às superfícies da mucosa. A função da fímbria F1 na colonização já foi parcialmente elucidada, tendo sido demonstrado que, com a deleção do gene *fimH*, *in vitro*, a virulência da cepa foi atenuada, reduzindo o poder de adesão e colonização da bactéria (Arnéet *et al.*, 2000). Em aves, foi observado que a fímbria F1 permite a adesão da bactéria aos pulmões, intestinos, baço e fígado (Pourbakhsh, *et al.*, 1997b; Dozoiset *et al.*, 2000).

Outra fímbria importante para APEC é a fímbria P ou F11 (*Pyelonephritis-associated pilus ou P blood antigen*), codificada pelo gene cromossômico *pap* e descrita pela primeira vez em UPEC como um pilus associado à pielonefrite (Sauer *et al.*, 2000). Na colibacilose aviária, sugere-se que a fímbria P esteja relacionada à colonização dos órgãos internos, a fim de causar infecções sistêmicas, não sendo expressa nos momentos iniciais da infecção (Pourbakhsh *et al.*, 1997a; La Ragione & Woodward, 2002). No entanto, foi demonstrado que mutantes para *pap* causaram morte em pintos de 1 dia, indicando que a fímbria P não é essencial para a patogenia e/ou que sua função pode ser compensada por outras adesinas (Stordeur *et al.*, 2004).

Curli, uma adesina formada por uma estrutura enrolada encontrada na superfície externa da maioria das cepas de *E. coli*, é codificada pelo gene *crl* (*Curli fiber gene*). Curli está relacionado à colonização pela bactéria através da sua habilidade de se ligar a fibronectina que confere à bactéria a capacidade de aderir aos tecidos de aves e contribuir na colonização de pintos de 1 dia (La Ragione *et al.*, 2000). Além disso, foi demonstrado por Gopha *et al.* (2001) que o curli é essencial para mediar a internalização de APEC em células eucarióticas, tornando-se um fator de virulência muito importante que contribui para o início da colonização.

A fímbria S, outra adesina encontrada em APEC, codificada pelo gene cromossômico *sfa/focCD* (*S fimbriae sialic acid-specific and F1C fimbriae*), é chamada dessa forma devido a sua especificidade em se ligar a resíduos de ácido siálico. A fímbria S é similar morfológicamente às fímbricas P e F1 e faz parte de uma família de adesinas fimbriadas produzidas por *E. coli* extra-intestinais (Hacker *et al.*, 1993). Está fortemente associada à meningite do

recém-nascido (NMEC) e a isolados de *E. coli* associado a sepse (Antão, *et al.*, 2009). A expressão de *sfa* está relacionada às condições do ambiente, como temperatura, osmolaridade, e presença de glicose no meio.

O gene *iha* (*Iron-regulated-gene-homologue adhesion*), encontrado frequentemente em cepas de *E. coli* uropatogênicas humanas, codifica uma adesina, inicialmente caracterizada em *E. coli* O157:H7, que confere à bactéria a habilidade de aderir ao uroepitélio (Johnson *et al.*, 2005a).

A fimbria *mat*, descrita pela primeira vez por Pouttu *et al.* (2001), é codificada pelo gene *mat* (*meningitis associated and temperature regulated fimbriae*), e sua expressão está associada com isolados que causam meningite do recém nascido. Possui uma massa molecular de 18 kDa e tem a expressão controlada pela temperatura, sendo detectada pouca fimbria em cultivos bacterianos a 37 °C (Pouttu *et al.*, 2001).

Outra família de adesinas fimbriadas é a das fímbricas Dr, também denominadas O75X, que são codificadas pelos genes do operon *dra* (*Dr antigen-specific adhesin*) e foram descritas originalmente como resistentes a manose e independente de hemaglutinação. As fímbricas Dr são expressas principalmente em isolados de UPEC pertencentes ao sorogrupo O75, e principalmente no fígado e na bexiga de humanos infectados. Em APEC, apresenta baixa prevalência, sendo encontrada em menos de 2 % dos isolados (Antão *et al.*, 2009).

Entre as adesinas afimbriadas, encontramos a família *afa*, codificada pelo gene *afa* (Afimbrial), que produz uma adesina de estrutura fina e de difícil visualização. A purificação e caracterização da proteína mostrou que AFA-I é encontrada tanto na superfície da bactéria quanto livre no meio de cultivo, apresentando-se como um agregado macromolecular formado por um polipeptídeo de 16 kDa de uma única subunidade repetida. Embora esse gene esteja comumente associado a isolados de *E. coli* patogênica de mamíferos, ele foi detectado entre isolados de APEC que não possuem o gene *pap* (Stourder *et al.*, 2002). Também foi demonstrado que *AfaD* promove a invasão de células epiteliais, e o gene *afa* está associado às *E. coli* enteropatogênicas e uropatogênicas humanas (Keller *et al.*, 2002; Kaper *et al.*, 2004; Antão *et al.*, 2009).

A Tsh (*Temperature sensitive hemagglutinin*) adesina responsável pela aglutinação de eritrócitos em temperaturas inferiores a 26°C, foi descrita pela primeira vez por Provence & Curtis (1994). Sua sequência apresenta homologia com proteínas da família de auto-transportadores secretadas por bactérias gram-negativas (Stathopoulos *et al.*, 1999). Tsh é produzido como uma proteína de 140 kDa processada em uma aglutinina de 33 kDa e um fragmento de 106 kDa com atividade de mucinase (Kobayashi *et al.*, 2007). A Tsh contribui

para os estágios iniciais da infecção, incluindo a colonização dos sacos aéreos e pulmões, porém não contribui para a colonização generalizada (Dozois *et al.*, 2000).

A Hra é uma proteína da membrana externa bacteriana, amplamente distribuído em cepas UPEC (Srinivasan *et al.*, 2003), que age como uma adesina não fimbriada e promove a aglutinação de eritrócitos humanos e animais e de células colônicas humanas. É codificada pelo gene *hrlA* (*heat resistance agglutinin*) e sua aglutinação é resistente ao calor.

### 1.5.2 Invasinas

Uma forma pela qual as bactérias sobrevivem no interior dos seus hospedeiros é pelo processo de invasão, que proporciona aos microrganismos uma forma de permanecer no hospedeiro sem estar em contato com os efeitos do soro. Com a invasão, a bactéria pode se manter no nicho celular a fim de se replicar ou apenas permanecer no interior do hospedeiro de forma quiescente.

A forma pela qual APEC atinge a circulação sistêmica, bem como, quando isso ocorre, ainda não é conhecida. Consequentemente, não se sabe se a entrada na circulação sanguínea ocorre pela invasão do epitélio ou pela fagocitose dos macrófagos (Dziva & Stevens, 2008). Experimentos *in vitro* mostraram que APEC é capaz de se manter de maneira viável dentro de macrófagos primários por até 24 horas (Mellata *et al.*, 2003).

Os mediadores bacterianos responsáveis pelo translado de Ex-PEC através das superfícies das mucosas não estão bem definidos. Para NMEC, foi demonstrado que a passagem da barreira hemato-encefálica é mediada por uma invasina codificada pelo gene *ibeA* (*Invasion of brain endothelium*). No entanto, esse mecanismo de invasão ainda não está totalmente elucidado. Em aves, foi sugerido que *ibeA* esteja relacionada com a invasão do epitélio dos pulmões e, consequentemente, com passagem de bactéria para a circulação sanguínea (Germon *et al.*, 2005; Moulin-Schouleur *et al.*, 2006).

Uma invasina em potencial identificada em APEC é o homólogo de proteína Tia (*toxigenic invasion locus in ETEC strains*), que foi descrita primeiramente para *E. coli* enterotoxigênica. Essa proteína influencia na adesão e na invasão de células de cultura ileocecais humanas e epitélio colônico (Fleckenstein *et al.*, 1996).

Outro fator relacionado à invasão é a ilha de patogenicidade *gimB* (*Genetic island associated with newborn meningitis*), uma região no DNA associado a isolados de NMEC, envolvida na manutenção dos altos níveis de bacteremia característicos da doença (Bonacorsi *et al.*, 2002).

### 1.5.3 Resistência ao soro

As bactérias *E. coli* patogênicas aviárias são, na maioria das vezes, resistentes à ação do soro (Ngeleka *et al.*, 1996). A resistência é conferida por uma conjunção de fatores, combinando os efeitos do LPS (lipopolissacarídeo), produção de aerobactina, cápsula K, antígeno O e proteínas de membrana (Wooley *et al.*, 1992; La Ragione & Woodward, 2002).

Muitas *E. coli* possuem plasmídeos que contêm o gene da colicina V (gene *cvi/cva*, *Structural genes of colicin V operon*). As colicinas são bacteriocinas letais ou que reduzem o crescimento de outras bactérias que não as produzem. A colicina V foi correlacionada à colissepticemia aviária pela primeira vez por Vidoto *et al.* (1990). O plasmídeo ColV pode possuir outros fatores de virulência, como genes para motilidade, resistência ao soro, sistemas sideróforos e adesinas (La Ragione & Woodward, 2002). A expressão da colicina V por si só não estava associada como um fator de virulência, mas sua presença serve como marcador para outros fatores presentes no plasmídeo. Entretanto, no trabalho de Zhao *et al.* (2009) foi observada a expressão da colicina V em pintos de um dia infectados por uma cepa APEC, indicando que a colicina, por si só, seria um fator associado à virulência importante para a infecção.

O gene que codifica a proteína Iss (*increased serum survival*), uma lipoproteína da membrana externa que apresenta propriedades contra o efeito do soro, foi descrito pela primeira vez por Binnset *et al.* (1979) e é encontrado em plasmídeos ColV. Acredita-se que Iss previna a deposição do complexo de ataque de membrana do complemento por um mecanismo ainda desconhecido. Há trabalhos que sugerem que o *iss* é mais importante na patogenicidade de *E. coli* aviárias do que na de *E. coli* humanas (Nolan *et al.*, 2003; Dziva & Stevens, 2008).

Outro fator importante na resistência ao soro é a proteína codificada pelo gene *traT* (*Transfer Protein*), que pode estar presente no plasmídeo de ColV ou em outros grandes

plasmídeos. Assim como a Iss, traT é uma lipoproteína de membrana presente na superfície externa da bactéria. Foi demonstrado que a proteína TraT aumenta a sobrevivência das células na presença do soro por antagonizar a deposição de C3 e inibir a formação do complexo C5b6 (Sukupolvi *et al.*, 1990; Wooley *et al.*, 1992).

A cápsula do tipo K1, codificada pelo gene neuC (K1 capsular polysaccharide), foi identificada por Brée *et al.* (1989) em isolados de APEC. A cápsula, composta por um polissacarídeo de ácido polisiálico, possui propriedades anti-fagocíticas e está associada às infecções extra-intestinais, tanto na septicemia quanto na celulite (Ngeleka *et al.*, 1996). A cápsula K1 é um fator associado à virulência essencial para NMEC causar a meningite do recém-nascido (La Ragione & Woodward, 2002; Kim, 2003).

Os genes *kpsMT II* (*Group II capsule antigens*) codificam as proteínas KpsM, uma proteína de membrana, e KpsT, uma ATPase que constituem o transportador ABC2 (casete tipo 2 de ligação a ATP), envolvido na exportação de polissacarídeos da membrana celular (Arecubieta *et al.*, 2000).

O gene cromossômico *ompA* (*Outer membrane protein*) codifica uma proteína da membrana externa produzida por *E. coli* e outras enterobactérias. *OmpA*, presente na maioria dos isolados de APEC, possui as funções de adesina e invasina, participa da formação de biofilmes, age como uma marcadora imunológica e serve de receptor para vários bacteriófagos (Nolan *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007).

#### 1.5.4 Sistemas de aquisição de ferro

A baixa concentração de ferro livre nos meios fisiológicos dos animais não é suficiente para permitir o crescimento bacteriano, que requer uma concentração de  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> de ferro. Grande parte das bactérias patogênicas extra-intestinais desenvolveu sistemas de alta afinidade para aquisição de ferro, que competem com os sideróforos dos hospedeiros, como as transferrinas, e que permitem o crescimento bacteriano em locais de baixas concentrações de ferro (Norton, 1997; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

O sistema da aerobactina é o sideróforo melhor caracterizado descrito como parte de uma ilha de patogenicidade de *Shigella* por Vokes *et al.* (1999). A aerobactina é codificada pelo operon composto pelos genes *iucABC* e *iut*, que podem estar em plasmídeos ou no

cromossomo, sendo que *luc* codifica o sideróforo hidroxamato que capta o ferro, e *lut* codifica o receptor da aerobactina. A aerobactina está correlacionada à causa de colissepticemia em frangos (Vidotto *et al.*, 1990; JANßEN *et al.*, 2001; La Ragione & Woodward, 2002), visto que a inserção do conjunto desses genes em uma bactéria comensal aumenta a letalidade em embriões de pinto e a habilidade de colonizar fígado de camundongo (Skyberg *et al.*, 2006).

A salmoquelina, fator que aumenta a virulência bacteriana, é outro sideróforo localizado em uma ilha de patogenicidade encontrada no plasmídeo ColV, codificada pelos genes *iroBCDEN* (*catecholate siderophore salmochelin receptor*). Foi demonstrado que a expressão da proteína IroN é regulada de acordo com a concentração de ferro presente no meio e aumentada na presença de urina humana, fluido ascítico ou sangue, de acordo com a origem das respectivas cepas de *E. coli* utilizadas (Sorsa *et al.*, 2003).

O sistema transportador de ferro é codificado pelo gene *sitABCD* (*Salmonella iron transport system gene*), que pode ser encontrado tanto no cromossomo quanto no episossomo. O *sitABCD* codifica permeases (proteínas integrais de membrana) que conferem à cepa APEC um aumento na multiplicação celular devido ao aumento na captura de ferro e manganês. Também atuam contra o estresse oxidativo, sendo possivelmente requeridos durante a interação com fagócitos (Sabriet *et al.*, 2006; 2008).

Outros genes relacionados à aquisição de ferro pela bactéria são *fyuA* (*Ferric yersinia uptake - yersiniabactin receptor*) e *irp2* (*Iron repressible protein yersiniabactin synthesis*), descritos pela primeira vez em *Yersinia enterocolitica* e já encontrados em *E. coli* enterocolítica patogênica para humanos e em cepas APEC. O gene *fyuA* codifica uma proteína que atua na captação de ferro, e *irp2* codifica uma proteína repressível ao ferro (Gophnaet *et al.*, 2001; La Ragione & Woodward, 2002; Schubert *et al.*, 2002).

O sideróforo codificado pelo gene *chuA* (*Heme receptor gene - E. coli haem utilization*) foi detectado em um levantamento por STM (*signature-tagged mutagenesis*) de APEC O2 (IMT5155) em frangos, sugerindo seu envolvimento nos mecanismos de virulência (Li, *et al.*, 2005).

Sugere-se que o gene *ireA* (*Iron-responsive element*), identificado por Russo *et al.* (2001) em um isolado de UPEC, esteja relacionado à captação de ferro. Sabe-se que *ireA* possui sua expressão aumentada na urina de humanos e contribui significativamente para a colonização da bexiga de camundongos (Russo *et al.*, 2001).



### 1.5.5 Toxinas

As bactérias patogênicas podem produzir substâncias que são tóxicas direta ou indiretamente para as células do seu hospedeiro (Finlay & Falkow, 1997).

A toxina autotransportadora vacuolizante, produto do gene *vat* (*vacuolating auto-transporter toxin*), induz a formação de vacúolos intracelulares, resultando em um efeito citotóxico similar aos efeitos causados pela toxina VacA de *Helicobacter pylori* (Parreira *et al.*, 2003).

EAST1 (*heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative E. coli*), a proteína codificada pelo gene *astA*, que está localizado em um transposon, apresenta alta similaridade com a toxina estável ao calor de ETEC. Ainda não foi determinado onde essa toxina é secretada. No entanto, sabe-se que *astA* é amplamente distribuída entre diferentes categorias de *E. coli* patogênicas intestinais tanto em humanos quanto em animais (Janßen *et al.*, 2001).

A hemolisina A ou  $\alpha$ -hemolisina, descrita pela primeira vez em APEC por Nagai *et al.* (1998), é codificada pelo gene *hlyA* (Hemolysin A), sendo produzida por algumas bactérias gram-negativas. A hemolisina é secretada por um sistema de secreção tipo I (Finlay & Falkow, 1997; La Ragione & Woodward, 2002).

A toxina codificada pelo gene *cnf 1/2* (*Cytotoxic necrotizing factor*) está relacionada à produção de  $\alpha$ -hemolisina. Foi observado que, em células VERO, *cnf1/2* leva à formação de células gigantes, multinucleadas e causa morte celular (De Rycke *et al.*, 1999).

O gene *sat* (*secreted autotransporter toxin*) codifica uma proteína de 107 kDa, descrita pela primeira vez por Guyeret *et al.* (2000). Sat possui atividade de serino-protease, e é citotóxica para células VERO de fígado, HK-2 de bexiga e HEp-2, sendo mais comumente expressa em isolados UPEC de pacientes com pielonefrite (Guyeret *et al.*, 2000).

### 1.5.6 Outros fatores de virulência

Existem outros fatores de virulência, que não se enquadram nas descrições anteriores por apresentarem diferentes atividades.

A proteína codificada pelo gene *pic* (*Serine protease autotransporter*) foi originalmente identificada em cultura de *E. coli* enteroagregativa e possui atividade serino-protease (Heimeret *et al.*, 2004).

Já as ilhas de patogenicidade *malX* (*Pathogenicity-associated island marker*), anteriormente consideradas apenas marcadores de patogenicidade, são atualmente consideradas como contribuintes para a patogenicidade da septicemia aviária (Johnson *et al.*, 2005).

## 2. OBJETIVOS DO TRABALHO

Este trabalho tem por objetivos:

1. Avaliar a suscetibilidade de isolados de *E. coli* recuperados de lesões de celulite e isolados de infecções sistêmicas de frangos de corte em relação aos principais agentes antimicrobianos empregados na avicultura;
2. Detectar a presença dos principais fatores associados à virulência por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) Multiplex;
3. Realizar a tipagem filogenética através do método ECOR;
4. Analisar o perfil filogenético dos isolados de celulite e colissepticemia pelo método de variação do espaçamento intergênico.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cepas bacterianas utilizadas

Foi utilizado nesse trabalho um total de 185 isolados de *E. coli* patogênica aviária, divididos em dois grupos, sendo 144 isolados, obtidos a partir de graves lesões de celulites em frangos de corte, provenientes de abatedouros da região norte do estado do Paraná; e 41 isolados de infecção sistêmica (colissepticemia) em frangos de corte, provenientes de abatedouros da região metropolitana de Porto Alegre, no estado do Rio Grande do Sul. As amostras de celulite foram isoladas no período de outubro de 2006 a maio de 2007; e as amostras de colissepticemia foram isoladas no período de setembro a novembro de 2007. Os isolados de colissepticemia foram obtidos da carcaça e de diferentes órgãos da ave, incluindo coração, sacos aéreos, fígado e intestino.

Todos os isolados foram obtidos no abatedouro, de frangos com idade média de 49 dias (7 semanas) recém-sacrificados, fornecidos pelo Dr. Benito de Guimarães Brito do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor.

As amostras foram recebidas em LB-ágar (Luria Bertani ágar) inclinado, a partir dos quais foram feitos estoques em caldo LB com 20% de glicerol e foram armazenados a -80° C.

Como controles positivos para a análise dos fatores de virulência foram utilizados as cepas IMT2470, IMT5155, IMT7920, IMT9267 e TK3 (Ewers *et al.*, 2007) fornecidas pela Dra. Crista Ewers do Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, da Freie Universität Berlin, em Berlim, Alemanha (Tabela 1).

**Tabela 1.** Cepas padrão para a Reação Multiplex

Gene(s) ou operon	Descrição	IMT 9096	IMT 2470	IMT 5155	TK3	IMT 9270	IMT 7240
<b>Adesinas</b>							
<i>afa/draB</i>	<i>Afimbrial/ Dr antigen-specific adhesin</i>	-	-	-	-	-	+
<i>crl</i>	<i>Curli fiber gene</i>	+	+	+	+	-	+
<i>fimC</i>	<i>Type 1 fimbriae (D-mannose specific adhesin)</i>	+	+	+	+	+	+
<i>hra</i>	<i>Heat-resistant agglutinin</i>	+	+	-	-	+	-
<i>iha</i>	<i>Iron-regulated-gene-homologue adhesin</i>	+	-	-	-	-	+
<i>papC</i>	<i>Pilus associated with pyelonephritis</i>	+	+	-	+	+	-
<i>sfa/focCD</i>	<i>S fimbriae (sialic acid-specific) and F1C fimbriae</i>	+	-	-	-	-	+
<i>tsh1</i>	<i>Temperature sensitive hemagglutinin</i>	-	+	+	-	-	-
<i>mat</i>	<i>Meningitis associated and temperature regulated fimbriae</i>	+	+	+	+	+	+
<b>Sideróforos</b>							
<i>chuA</i>	<i>Heme receptor gene (E. coli haem utilization)</i>	+	+	+	+	+	+
<i>fyuA</i>	<i>Ferric yersinia uptake (yersiniabactin receptor)</i>	+	+	+	+	+	+
<i>ireA</i>	<i>Iron-responsive element</i>	+	+	+	+	+	-
<i>iroN 1</i>	<i>Catechololate siderophore (salmochelina) receptor</i>	+	+	+	+	+	+
<i>irp2</i>	<i>Iron repressible protein (yersiniabactin synthesis)</i>	+	+	+	+	+	+
<i>iucD1</i>	<i>Aerobactin synthesis</i>	-	+	+	+	-	-
<i>sitD chr.</i>	<i>Salmonella iron transport system gene</i>	+	+	+	+	+	+
<i>sitD ep.1</i>	<i>Salmonella iron transport system gene</i>	-	+	+	+	-	-
<b>Resistência ao Soro</b>							
<i>cvi/cva1</i>	<i>Structural genes of colicin V operon (Microcin ColV)</i>	-	+	+	+	-	-
<i>iss1</i>	<i>Increased serum survival</i>	-	+	+	+	+	-
<i>neuC</i>	<i>K1 capsular polysaccharide</i>	-	+	+	+	+	-
<i>kpsMT II</i>	<i>Group II capsule antigens</i>	-	+	+	+	+	-
<i>ompA</i>	<i>Outer membrane protein</i>	+	+	+	+	+	+
<i>traT</i>	<i>Transfer Protein</i>	-	+	+	+	-	-
<b>Toxinas</b>							
<i>astA</i>	<i>EAST1 (heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative E. coli)</i>	-	+	-	-	-	-
<i>cnf1/2</i>	<i>Cytotoxic necrotizing factor</i>	+	-	-	-	+	-
<i>sat</i>	<i>Secreted autotransporter toxin</i>	-	-	-	-	+	-
<i>vat</i>	<i>Vacuolating autotransporter toxin</i>	-	+	+	+	+	+
<i>hlyA</i>	<i>Hemolysin A</i>	-	-	-	-	+	-
<b>Invasinas</b>							
<i>gimB</i>	<i>Genetic island associated with newborn meningitis</i>	-	+	+	+	+	-
<i>ibeA</i>	<i>Invasion of brain endothelium</i>	-	+	+	-	+	+
<i>tia</i>	<i>Toxigenic invasion locus in ETEC strains</i>	-	+	-	+	+	+
<b>Diversos</b>							
<i>pic</i>	<i>Serin protease autotransporter</i>	+	-	-	-	+	-
<i>malX</i>	<i>Pathogenicity-associated island marker</i>	+	+	+	+	+	-

### 3.2 Métodos de identificação

A confirmação que as amostras recebidas eram de *E. coli* foi realizada por meio de testes bioquímicos, para avaliar a fermentação da lactose, glicose, sacarose, formação de gás CO<sub>2</sub>, hidrólise da uréia e produção de H<sub>2</sub>S.

Primeiramente os isolados foram inoculados em ágar MacConkey (Acumedia) a fim de verificar se os mesmos eram Gram-negativos e positivos para a fermentação da lactose, o que se verifica pela coloração rósea da colônia.

Para realizar o ensaio TSI (três açúcares e ferro), que determina a capacidade da bactéria de utilizar os carboidratos incorporados no meio (glicose, lactose, sacarose), com ou sem produção de gás e H<sub>2</sub>S, a amostra foi inoculada através de uma picada com a agulha de platina até o fundo do ágar TSI (Vetec) inclinado, seguido de estriamento na superfície do meio. Após incubação a 37 °C durante a noite, foi realizada a leitura do resultado. A coloração amarela no ápice do tubo indica que a bactéria fermenta lactose; a manutenção da cor original do meio, indica que não há fermentação. A coloração amarela no fundo do tubo indica que a bactéria fermenta glicose; enquanto que a manutenção da cor do meio indica que não há fermentação. A produção de gás é detectada pelo aparecimento de bolhas de ar ou rachaduras no meio; em caso de ausência destas, a bactéria é considerada não produtora de gás. Ademais, a identificação da produção de H<sub>2</sub>S é observada através de precipitado preto no fundo do tubo.

Todos os isolados testados apresentaram fermentação de lactose e glicose, produção de gás e ausência da produção de H<sub>2</sub>S, indicando para *E. coli*.

Para testar a capacidade da bactéria de produzir urease, foi realizado o teste com uréia base (Vetec). Para isso foi feita uma estria na superfície desse meio com inóculo abundante e este foi incubado a 37 °C durante a noite. A interpretação do resultado do teste foi realizada, utilizando como controle positivo uma cepa de *Klebsiella sp.*. O teste é considerado positivo quando o meio se torna rosa devido a alcalinização resultante da ação da urease. Quando a coloração do meio é mantida, a amostra é considerada urease-negativa.

Todos os isolados testados foram negativos para a produção de urease, indicando para *E. coli*.

### **3.3 Método de difusão com discos Kirby e Bauer**

A fim de avaliar a suscetibilidade das amostras a diferentes agentes antimicrobianos, foi empregado o método de difusão com discos, descrito por Kirby e Bauer (1966). Para a realização do teste de difusão com discos, os isolados foram retirados do estoque e crescidos em meio BHI (*brain heart broth*) (Merck) durante a noite, a 37 °C, sob agitação orbital (80 ver/min). Duzentos microlitros da suspensão resultante foram diluídos a 5 mL de meio BHI e as amostras foram crescidas até o início da fase exponencial (com absorvância de 0,3 a 0,4 no comprimento de onda 600 nm, o que corresponde a aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ mL). Em seguida, as bactérias foram semeadas sobre a superfície de ágar Mueller-Hinton (Difco), contido em placas de Petri de 14 cm de diâmetro, com o auxílio de *swab*. Após foram depositados sobre a superfície do ágar (com pinça estéril) os discos com os antibióticos a serem testados. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e a leitura dos diâmetros dos halos de inibição foi realizada com o auxílio de um paquímetro. Os diâmetros foram comparados com uma tabela padrão do CLSI, que classifica as bactérias como sensíveis, intermediárias ou resistentes de acordo com o diâmetro da zona de inibição em milímetros (mm).

Foram testadas 15 agentes antimicrobianas (Cefar): ampicilina 10 UI bacitracina 10 UI; cefalotina 30 µg; ceftiofur 30 µg; ciprofloxacino 5 µg; cloranfenicol 30 µg; enrofloxacino 5 µg; gentamicina 10 µg; neomicina 30 µg; nitrofurantoína 300 µg; norfloxacino 10 µg; sulfonamidas 23,75 µg, + trimetoprima 1,25 µg; sulfonamidas 300 µg; tetraciclina 30 µg; trimetoprima 5 µg.

### **3.4 Extração de DNA**

A extração do DNA foi realizada através do método de fervura: 3 a 4 colônias bacterianas foram ressuspensas em 200 µL de água milli-Q, a suspensão foi resfriada a -20 °C por 10 minutos e em seguida incubada em banho a 100 °C por 10 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 14000 g por 10 minutos e mantidas a 4 °C para serem usadas posteriormente na reação da polimerase em cadeia (PCR), tipagem filogenética análise e filogenética.

### **3.5 Reação da polimerase em cadeia multiplex**

A detecção de fatores associados à virulência foi realizada através de 5 Reações de Polimerase em Cadeia Multiplex, para amplificar um total de 33 genes, conforme descrito por Ewers *et al.*, 2007. A detecção dos genes foi separada em 5 grupos (multiplex) conforme descrito na Tabela 1 e 2.

Todas as reações foram preparadas utilizando uma mistura de 25 µL (em água Milli-Q), contendo 2,5 µL de tampão de PCR 10 X, 2,0 µL de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U Taq DNA-polimerase (CENBIOT), 0,5 µL de cada dNTP 10 mM, 0,1 µL (10 pmol) do par de oligonucleotídeos iniciadores e 4 µL da amostra de DNA.

As reações foram feitas em termociclador (PCR Sprint, Thermo) nas seguintes condições: 3 minutos a 94 °C, 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C e 3 minutos a 68 °C, com um ciclo final de 10 minutos a 72 °C e após as reações foram mantidas a 4 °C.

A eletroforese em gel 1,5 % agarose com tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1 X dos amplicons foi realizada e comparada com o marcador tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen).



**Tabela 2.** Oligonucleotídeos usados para a detecção de genes associados à virulência em cepas APEC.

Gene(s) ou operon	Descrição	Sequencia do oligonucleotídeo iniciador (5'-3'; senso/antiseno)	Tamanho do amplicon	Referência
<b>Multiplex I</b>				
<i>sfa/focCDS</i>	<i>fimbriae (sialic acid-specific) and F1C fimbriae</i>	GTCCTGACTCATCTGAACTGCA CGGAGAACTGGGTGCATCTTA	1222 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>malX</i>	<i>Pathogenicity-associated island marker</i>	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	921 pb	Johnson e Stell, 2000
<i>neuC</i>	<i>K1 capsular polysaccharide</i>	GGTGGTACATTCCGGGATGTC AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	675 pb	Watt <i>et al.</i> , 2003
<i>iha</i>	<i>Iron-regulated-gene-homologue adhesin</i>	TAGTGC GTTGGGTTATCGCTC AAGCCAGAGTGGTTATTCGC	608 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>hrlA</i>	<i>Heat-resistant agglutinin</i>	TCACTTGCAGACCAGCGTTTC GTA ACTCACACTGCTGTCACT	540 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>fimC</i>	<i>Type 1 fimbriae (D-mannose specific adhesin)</i>	GGGTAGAAAATGCCGATGGTG CGTCATTTTGGGGTAAGTGC	496 pb	Janssen <i>et al.</i> , 2001
<i>pic</i>	<i>Serin protease autotransporter</i>	ACTGGATCTTAAGGCTCAGG TGGAATATCAGGGTGCCACT	410 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>kpsMT II</i>	<i>Group II capsule antigens</i>	gcgcattgctgatactgtg CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	269 pb	Johnson e Stell, 2000
<b>Multiplex II</b>				
<i>sitD ep.</i>	<i>Salmonella iron transport system gene</i>	CTATCGAGCAGGTGAGGA TTGAGAACGACAGCGACTTC	1032 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>ompA</i>	<i>Outer membrane protein</i>	AGCTATCGCGATTGCAGTG GGTGTGCCAGTAACCGG	918 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>iroN 1</i>	<i>Catecholate siderophore (salmochelin) receptor</i>	ATCCTCTGGTCGTAACCTG CTGCACTGGAAGAACTGTTCT	846 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>gimB</i>	<i>Genetic island associated with newborn meningitis</i>	TCCAGATTGAGCATATCCC CCTGTAACATGTTGGCTTCA	736 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>sitD chr.</i>	<i>Salmonella iron transport system gene</i>	ACTCCCATACACAGGATCTG CTGTCTGTGTCCGGAATGA	553 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>traT</i>	<i>Transfer Protein</i>	GTGGTGCGATGAGCACAG TAGTTCACATCTCCACCATCG	429 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>ibeA</i>	<i>Invasion of brain endothelium</i>	TGGAACCCGCTCGTAATATAC CTGCCTGTTCAAGCATTGCA	341 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>chuA</i>	<i>Heme receptor gene (E. coli haem utilization)</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTACCAAAGACA	278 pb	Clermont <i>et al.</i> , 2000
<b>Multiplex III</b>				
<i>vat</i>	<i>Vacuolating autotransporter toxin</i>	TCCTGGGACATAATGGTCAG GTGTCAGAACGGAATTGTC	980 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2004
<i>tsh</i>	<i>Temperature sensitive he magglutinin</i>	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC CTTCCGATGTTCTGAACGT	823 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2004
<i>iucD</i>	<i>Aerobactin synthesis</i>	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC CCTGATCCAGATGATGCTC	710 pb	Janssen <i>et al.</i> , 2001
<i>cvi/cva</i>	<i>Structural genes of colicin operon</i>	VTCCAAGCGGACCCCTTATAG CGCAGCATAGTTCCATGCT	597 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>papC</i>	<i>Pilus associated with pyelonephritis</i>	TGATATCACGCAGTCAGTAGC CCGGCCATATTCACATAAC	500 pb	Janssen <i>et al.</i> , 2001
<i>irp2</i>	<i>Iron repressible protein (yersiniabactin synthesis)</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	286 pb	Schubert <i>et al.</i> , 1998
<i>iss</i>	<i>Increased serum survival</i>	ATCACATAGGATTCTGCC CAGCGGAGTATAGATGCCA	309 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2005
<i>astA</i>	<i>heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative E. coli</i>	TGCCATCAACACAGTATATCC TCAGGTCCGAGTGACGGC	110 pb	Yamamotoe e Cherria 1996

Gene(s) ou nome	Descrição	Sequencia do oligonucleotídeo iniciador (5'-3'; senso/antiseno)	Tamanho do amplicon	Referência
<b>Multiplex IV</b>				
<i>mat</i>	<i>Meningitis associated and temperature regulated fimbriae</i>	TATACGCTGGACTGAGTCGTG CAGGTAGCGTCGAACTGTA	900 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>fyuA</i>	<i>Ferric yersinia uptake (yersiniabactin receptor)</i>	GCGACGGGAAGCGATGACTTA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	774 pb	Schubert <i>et al.</i> , 1998
<i>tia</i>	<i>Toxigenic invasion locus in ETEC strains</i>	AGCGCTTCCGTCAGGACTT ACCAGCATCCAGATAGCGAT	512 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>ireA</i>	<i>Iron-responsive element (putative catechol siderophore receptor)</i>	ATTGCCGTGATGTGTTCTGC CACGGATCACTTCAATGCGT	384 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>crlA</i>	<i>Curli fiber gene</i>	TTTCGATTGTCTGGCTGTATG CTTCAGATTCAGCGTCGTC	270 pb	Maurer <i>et al.</i> , 1998
<b>Multiplex V</b>				
<i>afa/drab</i>	<i>Afimbrial/ Dr specific adhesin</i>	TAAGGAAGTGAAGGAGCGTG CCAGTAACTGTCCGTGACA	809 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>sat</i>	<i>Secreted autotoxin</i>	TGCTGGCTCTGGAGGAAC TTGAACATTCAGAGTACCGGG	667 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2007
<i>cnf 1/2</i>	<i>Cytotoxic necrotizing factor</i>	TCGTTATAAAATCAAACAGTG CTTTACAATATTGACATGCTG	446 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2004
<i>hlyA</i>	<i>Hemolysin A</i>	GTCCATTGCCGATAAGTTT AAGTAATTTTTGCCGTGTTTT	350 pb	Ewerset <i>al.</i> , 2004

### **3.6 Tipagem Filogenética**

A tipagem filogenética foi realizada através do método descrito por Clermont, *et al.*, 2000.

Todas as reações de PCR foram realizadas em 20 µL contendo 2 µL 10x tampão PCR, 1,2 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U Taq DNA polimerase (CENBIOT), 0,5 µL 10 mM de cada dNTP, 0,1 µL (100 pmol) de cada par de oligonucleotídeos iniciadores (*chuA* for 5' GACGA-ACCAACGGTCAGGAT 3' e *chuA* rev 5' TGCCGCCAGTACCAAAGACA 3'; *yjaA* for 5' TGAAGTGTCAGGAGACGCTG 3' *yjaA* rev 5' ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC 3'; TspE4 for 5' GAGTAATGTCTGGGGCATTCA 3' e TspE4C2 rev 5' CGCGCCAACAAAGTATTACG 3') e 3 µL (40 ng) DNA da amostra. As reações foram submetidas às seguintes condições em um termociclador (PCR Sprint, Thermo): 4 min a 94 °C, 30 ciclos de 5 s a 94 °C e 10 s a 59 °C com um ciclo final de 5 min a 72 °C, e posteriormente mantidos a 4 °C

A eletroforese em gel 1,5 % agarose com tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1 X dos amplicons foi realizada e comparada com o marcador de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen).

### **3.7 Análise Filogenética**

A análise do perfil filogenético foi realizada pelo método ARDRA (Análise de Restrição de DNA Ribossômico Amplificado) conforme descrito por García-Martínez, *et al.*, 1996a.

Todas as reações de PCR foram realizadas em 50 µL contendo 5 µL 10x tampão PCR, 1,5 µL 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U Taq DNA polimerase (CENBIOT), 1 µL 10 mM de cada dNTP, 0,6 µL (600 pmol) do par de oligonucleotídeos iniciadores (16S14F for 5' CTT GTA CAC ACC GCC CGT C 3' e 23S1R rev 5' GGG TTT CCC CAT TCG GAA ATC 3') e 4 µL (40 ng) de DNA da amostra. As reações foram submetidas às seguintes condições em um termociclador (PCR Sprint, Thermo): 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C, e 2 min a 72 °C, com um ciclo final de 5 min a 72 °C, e posteriormente mantidos a 4 °C.

Oito µL do produto da PCR foram digeridos com 5 U das enzimas de restrição *RsaI*, *HinfI* ou *TaqI* e 5 µL do tampão correspondente. A reação foi incubada na temperatura de

37 °C (*RsaI* ou *HinfI*) (Promega) ou 65 °C (*TaqI*) (Ludwig Biotec) por 6 h e então mantidas a 4 °C.

A eletroforese em gel 1,5 % agarose com tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1 X dos amplicons foi realizada e comparada com o marcador de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen).

O dendograma foi gerado pelo programa NTSYSpc versão 2.0, através da utilização do método estatístico UPGMA.

### **3.8 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada por meio do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versão 16.0. A comparação das proporções para uma característica particular nas diferentes populações foi testada usando a comparação de Pearson, com  $p \leq 0.01$  indicando significância estatística.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos

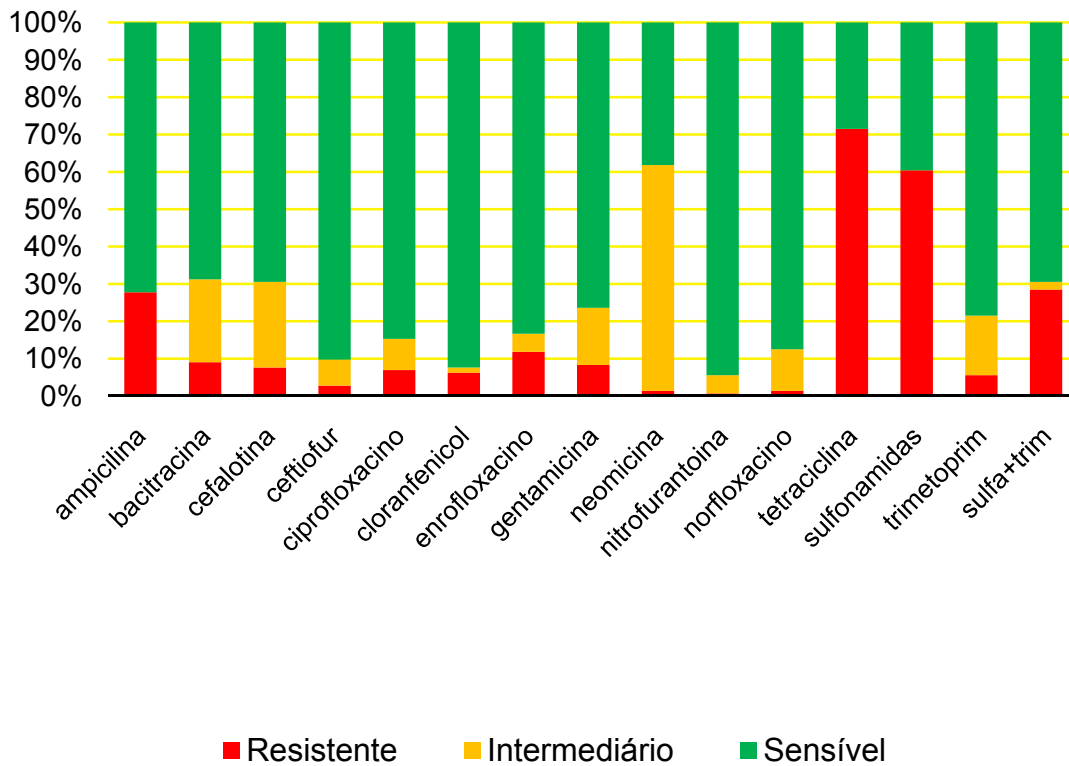
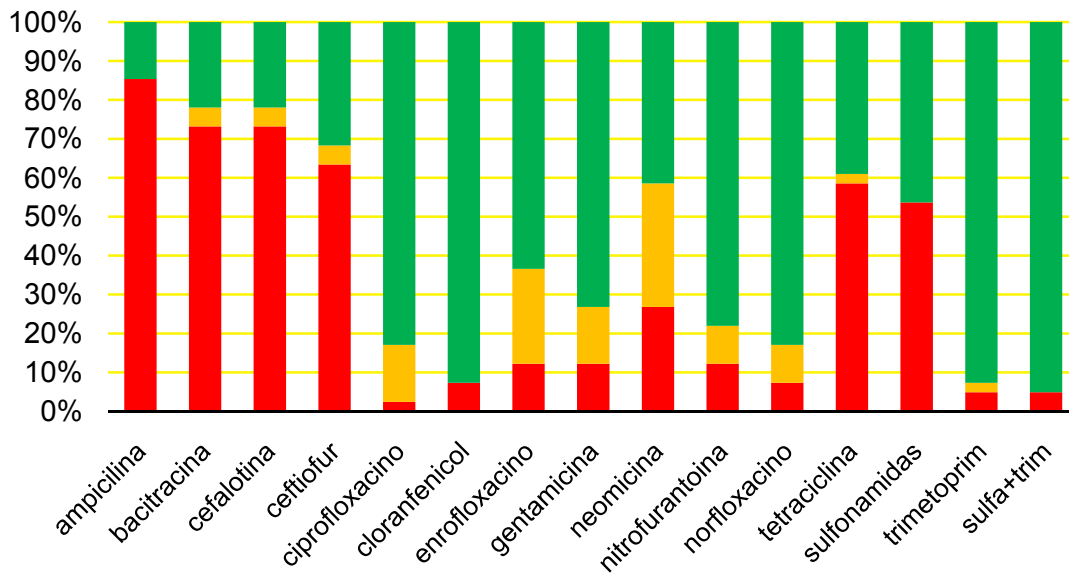
O objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas de *E. coli* isoladas de lesões localizadas (celulite) e de infecções sistêmicas (colissepse) em frangos de corte. O perfil desses isolados foi comparado ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas APEC de diferentes países. Foram utilizadas 144 isolados de *E. coli* obtidos de lesões severas de celulite e 41 isolados obtidos de colissepticemia, de frangos de corte do Paraná e do Rio Grande do Sul, respectivamente. É importante ressaltar que os isolados foram provenientes de granjas que não utilizam agentes antimicrobianos na promoção do crescimento desde o início dos anos 2000.

De maneira geral os isolados de APEC foram sensíveis à maioria dos agentes antimicrobianos testados (Tabela 3), com exceção da tetraciclina (70% de resistência) e das sulfonamidas, (60 % de resistência) (Fig. 2). Nos isolados de colissepticemia, além da resistência à tetraciclina e sulfonamidas, foi observada resistência aos agentes antimicrobianos que atuam na parede celular, como ampicilina (85 %), bacitracina (73 %), cefalotina (73 %) e ceftiofur (63 %) (Fig. 2 B) Enquanto nos isolados de colissepticemia, foi observada uma resistência de 92,7 % a pelo menos um desses agentes, nos isolados de celulite essa resistência foi de 29,2 % (Tabela 3).

À exceção dos antimicrobianos que atuam na parede celular, os isolados de celulite apresentaram padrão de resistência muito semelhante ao dos isolados de colissepticemia. Para os agentes antimicrobianos que possuem outros sítios de ação. Foi observado que, com exceção das sulfonamidas, 23,7 % dos isolados de APEC (celulite e colissepticemia) foram resistentes a um dos agentes antimicrobianos que atuam antagonizando a atividade do metabolismo (trimetoprim, sulfonamidas + trimetoprim); com exceção da tetraciclina, 17,8 % dos isolados apresentaram resistência a 1 dos agentes antimicrobianos que atuam na inibição da síntese proteica (cloranfenicol, gentamicina, neomicina); e apenas 9,5 % dos isolados foram resistentes a um dos agentes antimicrobianos que atuam inibindo a síntese de ácidos nucleicos (ciprofloxacino, norfloxacino, enrofloxacino) (Fig. 2).

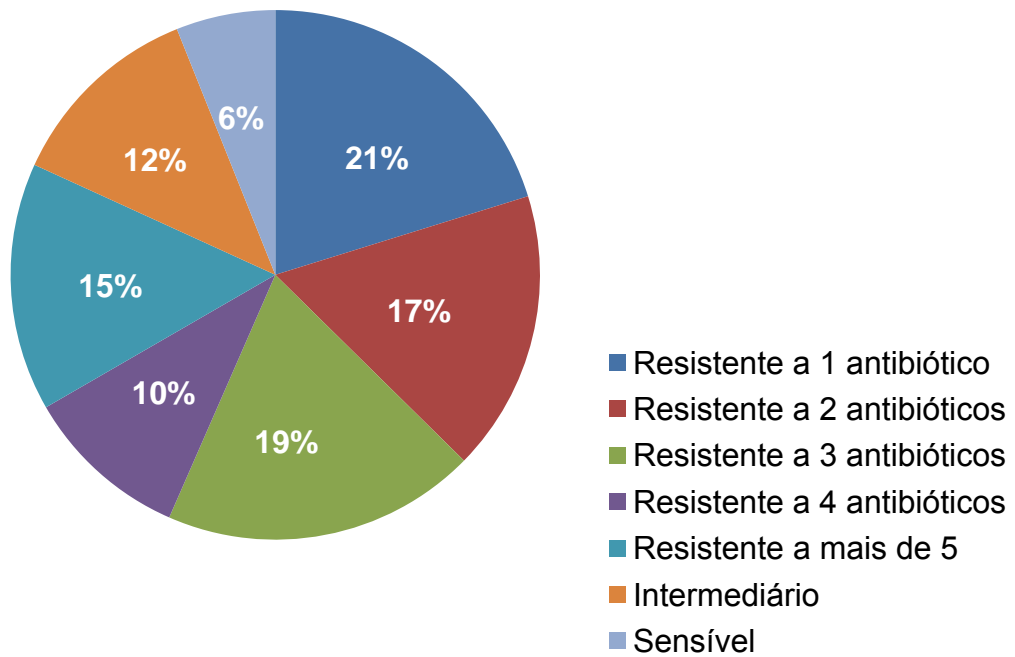
Em quase todos os isolados de APEC foi observada resistência a pelo menos um dos agentes antimicrobianos testados (Fig. 3), e nenhum fármaco apresentou eficiência como antimicrobiano para todas as cepas testadas.

Cinquenta e um por cento dos isolados de colissepticemia e 16 % dos isolados de celulite apresentaram resistência a mais de 5 agentes antimicrobianos. Os isolados de celulite foram mais sensíveis aos agentes antimicrobianos do que os isolados de colissepticemia (Fig. 3).

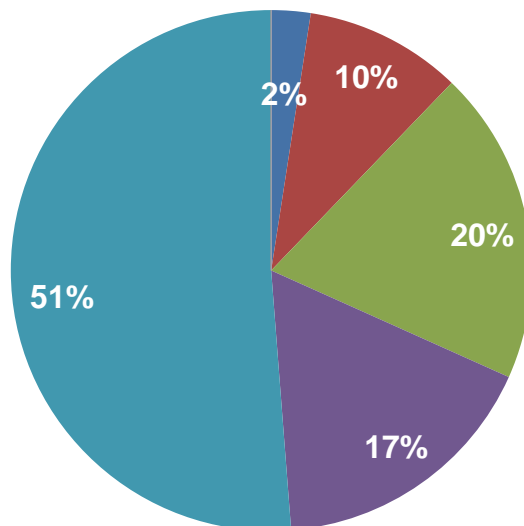
**A****B**

**Figura. 2.** Suscetibilidade a 15 agentes antimicrobianos. Resultados do teste de difusão em discos para (A) 144 isolados de APEC de lesões de celulite e (B) 41 isolados de colissepticemia.

**A**



**B**



**Figura. 3.** Padrão de Multi-resistência dos Isolados de APEC. Resultados da resistência a agentes antimicrobianos para (A) isolados de celulite e (B) isolados de colisepticemia.



**Tabela 3.** Resistência aos Agentes Antimicrobianos em Isolados de Celulite e de Colisepcemia.

<b>Resistência antimicrobianos</b>		<b>Celulite n=144 (%)</b>	<b>Colisepcemia n=41 (%)</b>	<b>Total n=185 (%)</b>
ampicilina	10 un	40 (27.7)	35 (85.4)	75 (40.5)
bacitracina	10 un	13 (9.0)	30 (73.2)	43 (23.2)
cefalotina	30 µg	11 (7.6)	30 (73.2)	41 (22.2)
ceftiofur	30 µg	4 (2.8)	26 (63.4)	30 (16.2)
ciprofloxacino	5 µg	10 (6.9)	1 (2.5)	11 (5.9)
cloranfenicol	30 µg	9 (6.3)	3 (7.3)	12 (6.5)
enrofloxacino	5 µg	17 (11.8)	5 (12.2)	22 (11.9)
gentamicina	10 µg	12 (8.3)	5 (12.2)	17 (9.2)
neomicina	30 µg	2 (1.4)	11 (26.9)	13 (7.0)
nitrofurantoina	300 µg	1 (0.7)	5 (12.2)	6 (3.2)
norfloxacino	10 µg	2 (1.4)	3 (7.3)	5 (2.7)
tetraciclina	30 µg	103 (71.5)	24 (58.5)	127 (68.6)
sulfonamidas	300 µg	87 (60.4)	22 (53.6)	109 (58.9)
trimetoprim	5 µg	8 (5.6)	2 (4.9)	10 (5.4)
sulfa+trimetoprim	23.7+ 1.3 µg	41 (28.5)	2 (4.9)	43 (23.2)

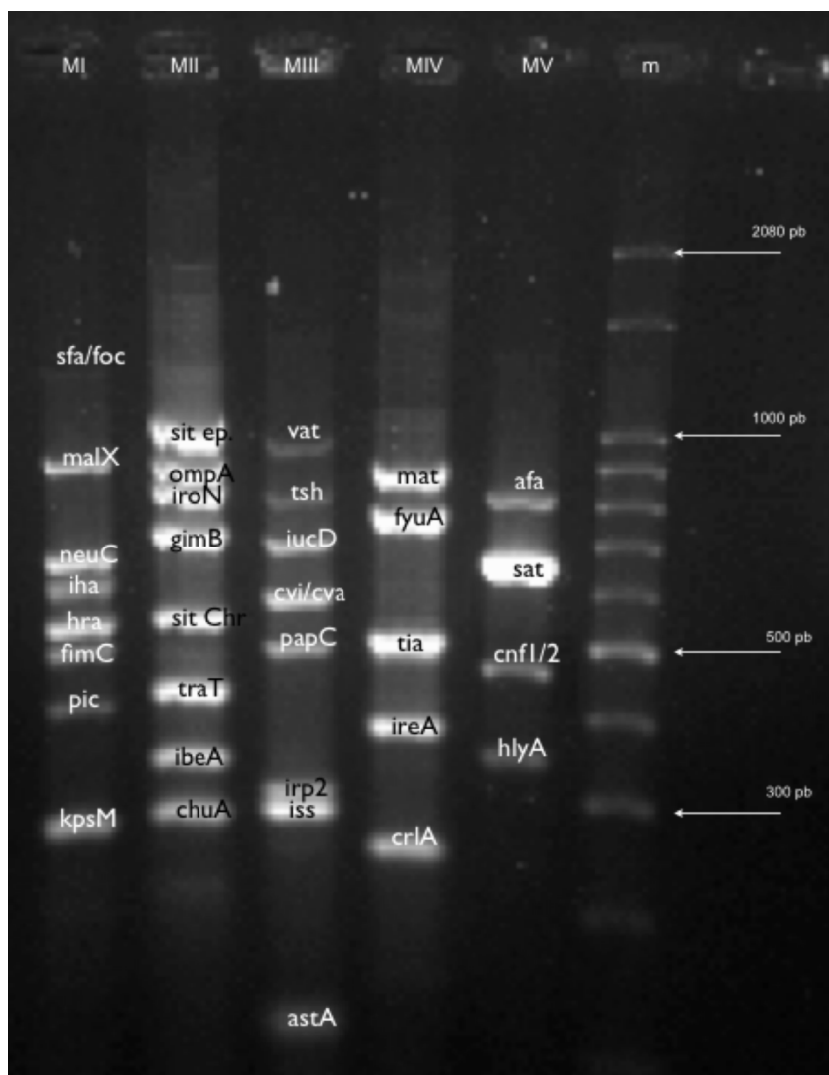
## 4.2 Prevalência dos fatores associados à virulência

Neste item, será apresentada a análise da presença de fatores mais comumente associados à patogenicidade de APEC, e, também, a investigação da possível existência de diferenças genéticas entre isolados de infecções localizadas (celulite) e de infecções sistêmicas (colissepticemia), através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), empregando múltiplos pares de oligonucleotídeos iniciadores. Foram investigados 33 genes codificadores de fatores de virulência em 144 isolados de celulite e 41 isolados de colissepticemia. A reação em cadeia multiplex tem a vantagem de permitir a análise da presença de vários genes em uma única PCR.

A prevalência dos fatores associados à virulência obtida neste estudo, para os isolados de celulite e colissepticemia, é apresentada na Tabela 4.

Os isolados de APEC, de modo geral, apresentaram de 6 a 23 dos 33 fatores de virulência investigados. Para as amostras de celulite foram detectadas, em média, 14.6 fatores associados à virulência por isolado, enquanto que para as amostras de colissepticemia foram detectados, em média, 12.3 fatores (Fig. 5). Dentre os isolados, 36 % dos de celulite e 15 % dos de colissepticemia apresentaram entre 16 e 20 VAGs.

Para todos os isolados foi detectado pelo menos um fator relacionado à adesão (*afa/dra*, *crlA*, *fimC*, *hra*, *iha*, *papC*, *mat*, *sfa/foc* e *tsh*); os isolados de colissepticemia apresentaram em média 3,9 desses fatores, e os de celulite, 4.3. Todas as cepas apresentaram pelo menos um fator de virulência relacionado à aquisição de ferro (*chuA*, *fyuA*, *ireA*, *iroN*, *irp2*, *iucD*, *sitB* epissômico e *sitB* cromossômico); em média 3.6 desses fatores foram detectados em isolados de colissepticemia, e 4.8 em isolados de celulite. Todas as cepas também apresentaram pelo menos um fator relacionado à resistência ao soro (*cvi/cva*, *iss*, *neuC*, *ompA* e *traT*, *kpsMT II*); em média 3.5 desses fatores foram detectados em isolados de colissepticemia e 4.0 em isolados de celulite. Em 50 % das amostras foi encontrado pelo menos um dos fatores de virulência relacionados à produção de toxinas (*vat*, *astA*, *hlyA*, *cnf 1/2*, *sat*), e em 35 % das amostras foi encontrado pelo menos um dos fatores de virulência relacionados à invasão (*gimB*, *tia* e *ibeA*). Além disso, todas as amostras analisadas apresentaram pelo menos um dos fatores de virulência comumente localizados em grandes plasmídeos (*cvi/cva*, *sit* epissômico, *iucD*, *iss*, *traT*, *iroN* e *tsh*). Em média, 4.0 desses fatores foram encontrados em isolados de colissepticemia, e 4.5 em isolados de celulite.



**Figura. 4.** Produtos de amplificação do PCR multiplex PCR (M): Todos os genes foram amplificados usando conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores I–V . m: marcador de peso molecular 100- bp. MI: conjunto DNA da cepas IMT9267 e IMT7920 (amplicons: *kpsMTII* [280 bp], *pic* [409 bp], *fimC* [477 bp], *hra* [537 bp], *iha* [609 bp], *neuC* [676 bp], *malX* [922 bp], e *sfa/foc* [1242 bp]). MII: cepa IMT5155 (amplicons: *chuA* [278 bp], *ibeA* [342 bp], *traT* [430 bp], *sit chr.* [554 bp], *gimB* [736 bp], *iron* [847 bp], *ompA* [919 bp], e *sit ep.* [1052 bp]). MIII: cepa IMT2470 (amplicons: *EAST-1* [116 bp], *iss* [309 bp], *irp2* [413 bp], *papC* [501 bp], *cvi/cva* [598 bp], *iucD* [714 bp], *tsh* [824 bp], e *vat* [981 bp]). MIV: cepa TK3 (amplicons: *crlA* [270 bp], *ireA* [384 bp], *tia* [512 bp], *fyuA* [774 bp] e *mat* [900 bp]). MV: cepa IMT9267 e IMT 7920 (amplicons: *hlyA* [350 bp], *cnf1/2* [446 bp], *sat* [667 bp] e *afa* [810 bp]).

**Tabela 4.** Prevalência dos Fatores Associados à Virulência em isolados APEC de Celulite e Colissep- tícemia.

Gene(s) ou operon	Descrição	Isolados de Celulite n= 144 (%)	Isolados de Colissep- tícemia n= 41 (%)	Isolados APEC total n=185 (%)
<b>Adesinas</b>				
<i>afa/draB</i>	<i>Afimbrial/ Dr antigen-specific adhesin</i>	0 (0)	0 (0)	0(0)
<i>crl</i>	<i>Curl fiber gene</i>	127 (88.2)	39 (95.2)	166(89,7)
<i>fimC</i>	<i>Type 1 fimbriae (D-mannose specific adhesin)</i>	138 (95.8)	41 (100)	179 (96,7)
<i>hra</i>	<i>Heat-resistant agglutinin</i>	66 (45.8)	8 (19.5)	74 (40)
<i>iha</i>	<i>Iron-regulated-gene-homologue adhesin</i>	43 (29.9)	4 (9.7)	47(25,4)
<i>papC</i>	<i>Pilus associated with pyelonephritis</i>	44 (30.5)	11 (26.8)	55 (29,7)
<i>sfa/focCD</i>	<i>S fimbriae (sialic acid-specific) and F1C fimbriae</i>	6 (4.2)	1 (2.4)	7 (3,8)
<i>tsh<sup>1</sup></i>	<i>Temperature sensitive hemagglutinin</i>	95 (65.9)	19 (46.3)	114(61,2)
<i>mat</i>	<i>Meningitis associated and temperature regulated fimbriae</i>	101 (70.2)	39 (95.2)	140(75,7)
<b>Sideróforos</b>				
<i>chuA</i>	<i>Heme receptor gene (E. coli haem utilization)</i>	84 (58.3)	25 (60.9)	109(58,9)
<i>fyuA</i>	<i>Ferric yersinia uptake (yersiniabactin receptor)</i>	67 (46.5)	5 (12.2)	72 (38,9)
<i>ireA</i>	<i>Iron-responsive element</i>	99 (68.8)	28 (68.3)	127(68,6)
<i>iroN<sup>1</sup></i>	<i>Catechol siderophore (salmochelins) receptor</i>	109 (75.7)	14 (34.1)	123(66,5)
<i>irp2</i>	<i>Iron repressible protein (yersiniabactin synthesis)</i>	97 (67.4)	21 (51.2)	118 (63,8)
<i>iucD<sup>1</sup></i>	<i>Aerobactin synthesis</i>	116 (80.5)	35 (85.4)	151(81,6)
<i>sitD chr.</i>	<i>Salmonella iron transport system gene</i>	20 (13.9)	6 (14.6)	26 (14,0)
<i>sitD ep.<sup>1</sup></i>	<i>Salmonella iron transport system gene</i>	99 (68.8)	16 (39.0)	115 (62,2)
<b>Resistência ao Soro</b>				
<i>cvi/cva<sup>1</sup></i>	<i>Structural genes of colicin V operon (Microcin ColV)</i>	82(56.9)	22 (53.6)	104 (56,2)
<i>iss<sup>1</sup></i>	<i>Increased serum survival</i>	113 (78.5)	36 (87.8)	149 (80,5)
<i>neuC</i>	<i>K1 capsular polysaccharide</i>	30 (20.8)	3 (7.3)	33(17,9)
<i>kpsMT II</i>	<i>Group II capsule antigens</i>	78 (54.2)	13 (31,7)	91 (49,2)
<i>ompA</i>	<i>Outer membrane protein</i>	137 (95.1)	37 (90.2)	174(94,0)
<i>traT</i>	<i>Transfer Protein</i>	129 (89.6)	33(80,5)	162 (87,5)
<b>Toxinas</b>				
<i>astA</i>	<i>heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative E. coli</i>	46 (31.9)	16 (39.0)	62(33,5)
<i>cnf1/2</i>	<i>Cytotoxic necrotizing factor</i>	0 (0)	1 (2.4)	1(0,5)
<i>sat</i>	<i>Secreted autotransporter toxin</i>	2 (1.4)	2 (4,9)	4 (2,2)
<i>vat</i>	<i>Vacuolating autotransporter toxin</i>	51 (35.4)	8 (19.5)	59 (31,9)
<i>hlyA</i>	<i>Hemolysin A</i>	1 (0.7)	0 (0)	1(0,5)
<b>Invasinas</b>				
<i>gimB</i>	<i>Genetic island associated with newborn meningitis</i>	14 (9.7)	3 ( 7.3)	17(9,2)
<i>ibeA</i>	<i>Invasion of brain endothelium</i>	29 (20.1)	7 (17.1)	36(19,5)
<i>tia</i>	<i>Toxigenic invasion locus in ETEC strains</i>	26 (18.0)	5 (12.2)	31 (16,7)
<b>Diversos</b>				
<i>pic</i>	<i>Serin protease autotransporter</i>	47 (32.6)	4 (9.7)	51(27,6)
<i>malX</i>	<i>Pathogenicity-associated island marker</i>	11 (7.6)	3 (7.3)	14(7,6)

<sup>1</sup>Genes associados a grandes plasmídeos de APEC (pAPEC-O1-CoIBM; pAPEC-O2-CoIV; pTJ100)

Os genes comumente presentes em plasmídeos de Colicina V (ColV) (*iroN*, *iss*, *iucD*, *sitD*, *traT*, *tsh*) ocorreram na maioria dos isolados, tendo sua prevalência variado entre 87.5 e 61.2 %. O gene da colicina (*cvi/cva*) estava presente em 56.6 % dos 185 isolados. Os fatores relacionados aos plasmídeos estão presentes mais frequentemente em isolados de celulite do que em isolados de colissepticemia (Tabela 4).

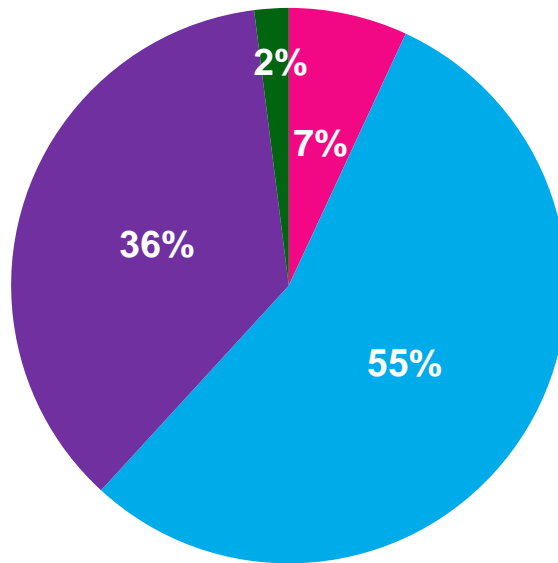
Os fatores associados à virulência *fimC*, *ompA*, *crlA* e *traT* (96.7 %, 94.0 %, 89.7 % e 87.5 %, respectivamente) foram os mais prevalentes nos isolados de APEC, tanto para celulite quanto para colissepticemia.

Os fatores relacionados à cápsula polisacarídea apresentaram a maior divergência entre os grupos: *neuC* esteve presente em 20.8 % dos isolados de celulite e em 7.3 % dos isolados de colissepticemia, enquanto a *kps MTII* esteve presente em 54.2 % e 31.7 % dos isolados, respectivamente (Tabela 4).

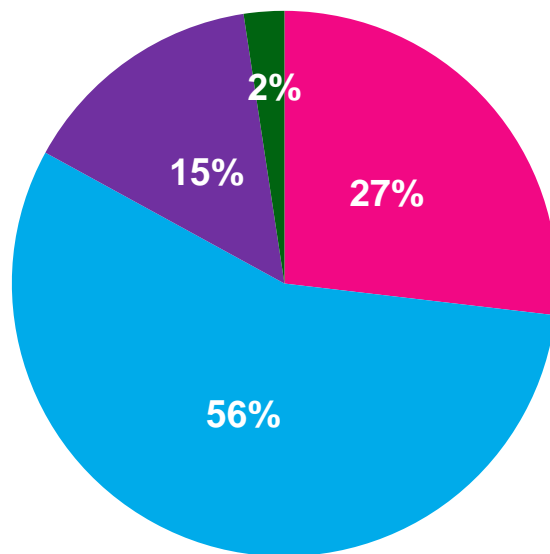
Os isolados de *E. coli* não podem ser discriminados entre celulite e colissepticemia através da análise somente da presença ou ausência dos 33 fatores associados à virulência. Esse resultado dá suporte à ideia de que isolados que causam lesões localizadas (celulite) ou infecções sistêmicas (colissepticemia) não apresentam um patotipo específico para determinada doença. Assim, o importante para definir a natureza da doença é o sítio de entrada da bactéria.

A fim de analisar a associação entre os genes, foi realizado o teste estatístico de comparação de proporções para uma característica particular em diferentes populações. Foi observada associação entre celulite e colissepticemia em relação a *malX* e *sfa/foc*; *gimB* e *sfa/foc*; *iha* e *neuC*; e *tia* e *papC* (Fig. 6).

**A**



**B**



- menos de 10 VAGs
- entre 11 a 15 VAGs
- entre 16 a 20 VAGs
- mais que 20 VAGs

**Figura. 5.** Padrão de Fatores Associados à Virulência. Resultados dos fatores associados à virulência para (A) isolados de celulite e (B) isolados de colissepticemia.

**Figura. 6.** Associação entre 33 fatores associados à virulência em isolados de Celulite e Colisepticemia.  $p \leq 0.01$  para Celulite (+); Colissepticemia (#); Celulite e Colissepticemia (&) e  $p \geq 0.01$  para ambos (-)

	Sfa/foc	malX	neuC	iha	hra	pic	kpsMT	sitB ep.	ompA	iroN	gimB	sitB ch.	traT	ibeA	chuA	vat	tsh	iucD	cvi/cva	papC	irp2	iss	astA	mat	fyuA	tia	ireA	crl	sat	fimC	hlyA
sfa/foc																															
malX	&																														
neuC	+	#																													
iha	-	#	&																												
hra	-	-	-	-																											
pic	-	-	-	-	-																										
kpsMT	-	#	#	-	-	-																									
sitB ep.	-	-	-	-	-	-	-																								
ompA	-	-	-	-	-	-	-	+																							
iroN	-	-	-	-	+	-	-	+	+																						
gimB	&	-	-	-	-	-	-	-	-	-																					
sitB ch.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	#	#																				
traT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																			
ibeA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-																		
chuA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																	
vat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+																
tsh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	#															
iucD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-														
cvi/cva	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	#	-	-													
papC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-												
irp2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+											
iss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
astA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#												
mat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
fyuA	#	#	#	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
tia	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	&	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ireA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
crl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
fimC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
hlyA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

### 4.3 Tipagem Filogenética

De acordo com análises filogenéticas, isolados de *E. coli* podem ser separados em 4 grupos filogenéticos principais (A, B1, B2 e D). Os isolados causadores de infecções extra-intestinais estão associados principalmente ao grupo B2 e em menor quantidade ao grupo D. Os isolados patogênicos provenientes de animais estão mais associados ao grupo B1, enquanto os isolados comensais estariam mais associados ao grupo A, composto tanto de isolados da microbiota de humanos, quanto da microbiota de animais (Herzer *et al.*, 1990; Clermont *et al.*, 2000).

Anteriormente, análises filogenéticas eram realizadas através de eletroforese de enzimas multilocus (MLEE), uma técnica complexa, laboriosa e que requer uma coleção de isolados já tipados (Herzer *et al.*, 1990).

Através da criação de uma biblioteca subtrativa de 2 isolados de *E. coli* de grupos filogenéticos diferentes e da caracterização de um fragmento de DNA que está fortemente associado à meningite do recém nascido, Clermont *et al.* (2000) sugeriram que genes ou fragmentos de DNA poderiam ser marcadores específicos dos grupos filogenéticos. Os marcadores utilizados foram os genes *chuA* (requerido para o transporte do grupo heme em *E. coli* enterohemorrágica O157:H7) e *yjaA* (identificado no genoma de *E. coli* K-12) e o fragmento de DNA TSPE4.C2, proveniente da biblioteca subtrativa (Clermont *et al.*, 2000). Através da união desses genes outros autores desenvolveram o método ECOR, hoje amplamente empregado na tipagem filogenética, por ser uma técnica fácil, rápida e que não requer uma coleção de isolados previamente testados.

Os isolados são classificados de acordo com o padrão de bandas apresentado. Pertencem ao grupo A os isolados *chuA*(-), *yjaA* (+/-) e TSPE4.C2 (-); pertencem ao grupo B1 os isolados *chuA*(-), *yjaA* (+/-) e TSPE4.C2 (+); pertencem ao grupo B2 os isolados *chuA*(+), *yjaA* (+) e TSPE4.C2 (+/-) e pertencem ao grupo D os isolados *chuA*(+), *yjaA* (-) e TSPE4.C2 (+/-).

No presente trabalho, realizamos a tipagem filogenética pelo método descrito por Clermont *et al.*, (2000), de 58 isolados de *E. coli* obtidos de lesões severas de celulite de frangos de corte do Paraná e de 41 isolados obtidos de infecções sistêmicas de frangos de corte do Rio Grande do Sul.

De acordo com os resultados da tipagem filogenética, apresentados na Tabela 5, mais de 50 % dos isolados de APEC avaliados pertencem ao grupo D.



Os isolados de colissepticemia pertencem, em sua maioria, ao grupo D, e em menor quantidade aos grupos A e B2. A maioria dos isolados de celulite (62,1 %) pertencem ao grupo D.

O grupo B1 compreendeu a menor proporção (8,1 %) dos isolados testados.

**Tabela 5.** Análise do Grupamento Filogenético ECOR em isolados de Celulite e Colisseplicemia.

Grupo EcoR	Isolados de Celulite		Isolados de Colisseplicemia		Isolados de APEC	
	n=58	(%)	n= 41	(%)	n= 99	(%)
<b>A</b>	10	17.2	11	26.8	21	21.2
<b>B1</b>	3	5.2	5	12.2	8	8.1
<b>B2</b>	9	15.5	10	24.4	19	19.2
<b>D</b>	36	62.1	15	36.6	51	51.5

#### 4.4 Análise Filogenética

A análise filogenética é utilizada para mensurar através de marcadores moleculares, a diversidade genética, entre diferentes isolados. É uma ferramenta importante para identificar as diferenças entre os isolados de acordo com a região geográfica, com a presença de fatores associados à virulência e com diferentes formas da doença (García-Martínez *et al.*, 1996a; Maurer *et al.*, 1998).

O conceito de relógio evolucionário está relacionado com a taxa de mudanças genotípicas. Os primeiros a tratarem cientificamente de cronômetros moleculares foram Zuckerkandl & Pauling (1965), o que forneceu subsídios aos microbiologistas, que precisavam resolver os problemas das relações naturais entre bactérias. Em princípio, qualquer molécula que sofre mutações aleatoriamente em determinado tempo pode ser considerada um cronômetro. A quantidade de mudanças que uma sequência acumula (formalmente chamada de distância) é o produto de uma taxa (na qual as mutações tornam-se fixas) *versus* um tempo (durante o qual as mudanças ocorreram). Um bom marcador molecular deve representar a taxa geral da mudança evolucionária de uma linha de descendentes (Woese, 1987).

As moléculas mais úteis para o estabelecimento da relação filogenética são as que representam funções altamente conservadas. As mudanças nas sequências de tais moléculas são lentas o suficiente para cobrir todo o espectro evolucionário. Os ácidos ribonucleicos ribossômicos (rRNA) são considerados os marcadores moleculares mais adequados para estudos de diversidade. Os genes da região do espaçamento intergênico na região 16S-23S do DNA ribossômico (ISR) estão universalmente distribuídos, apresentando o maior grau de conservação existente e estando presentes com múltiplas cópias no genoma de *E. coli* (Antón *et al.*, 1998). No genoma de APEC O1, observamos a presença de 4 cópias do ISR com tamanho entre 480 e 540 pb. Os polimorfismos presentes nas sequências de ISR podem apresentar-se em maior ou menor extensão nos diferentes isolados (Woese, 1987; García-Martínez *et al.*, 1996b; Bouchert *et al.*, 2008).

Existem diferentes técnicas que permitem realizar a análise filogenética de isolados de uma mesma espécie (intra-espécie). Essas técnicas são universalmente aplicáveis, altamente reprodutíveis e relativamente fáceis de realizar. A técnica conhecida como ARDRA (Análise de Restrição de DNA Ribossômico Amplificado) utiliza-se das características do RNA ribossômico, é baseada em padrões de restrição enzimática usando enzimas selecio-

nadas com base na sua habilidade de revelar polimorfismos nos fragmentos de DNA analisados, e no grau de conservação dos sítios de restrição do ISR, que reflete padrões filogenéticos (García-Martinez *et al.*, 1996b; Bouchert *et al.*, 2008).

No presente estudo, foi realizada a análise filogenética de 90 isolados de *E. coli* obtidos de lesões severas de celulite e 41 isolados obtidos de colissepticemia, de frangos de corte do Paraná e Rio Grande do Sul, respectivamente. Para isso, foi utilizado o método ARDRA, em que a região ISR foi amplificada com o uso de oligonucleotídeos iniciadores universais e seus produtos foram digeridos por enzimas de restrição (*Rsal*, *Hinfl* ou *TaqI*). Após a digestão pelas enzimas de restrição, uma matriz binária dos dados originais foi construída, compreendendo o universo total das bandas de todos os perfis gerados pelas 3 enzimas. Para cada posição de migração foram atribuídos os valores 1 ou 0, indicando a presença ou a ausência de uma banda, respectivamente. Os isolados foram agrupados pelo método de análise de grupos não pareados (UPGMA) e representados graficamente através de um dendrograma, que mostra as relações filogenéticas dos isolados.

Os resultados obtidos a partir do método ARDRA mostraram que existem diferenças entre os isolados de celulite e colissepticemia (Fig. 9) e entre os isolados de cada grupo (Fig. 8 e 9).

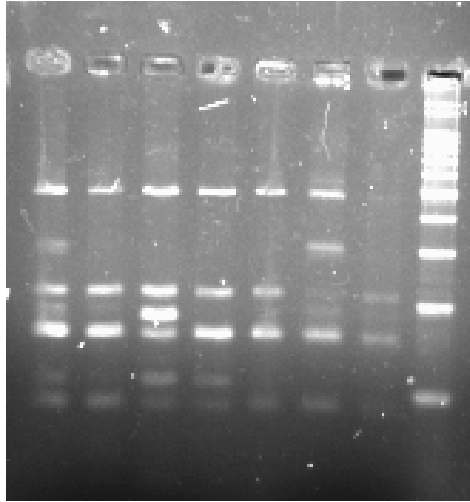
Analisando o dendrograma gerado apenas com os isolados de colissepticemia (Fig.8) pudemos observar que, com 80 % de similaridade, foi possível dividir os isolados em 7 grupos. Entre esses o grupo B possui os isolados mais virulentos e dos grupos ECOR B2 e D, que estão associados a isolados patogênicos. Com base em nossos resultados, não podemos afirmar que existam clones localizados em uma mesma região geográfica, visto que os isolados apresentaram padrões diferentes, mesmo isolados da mesma localidade.

De acordo com o dendrograma gerado apenas com os isolados de celulite (Fig. 9) pudemos observar que, com 80 % de similaridade, foi possível dividir os isolados em 10 grupos. Entre esses o grupo B possui os isolados mais virulentos e dos grupos ECOR B2 e D. Foi observado, em relação aos isolados de colissepticemia, uma população mais divergente com até 55 % de similaridade.

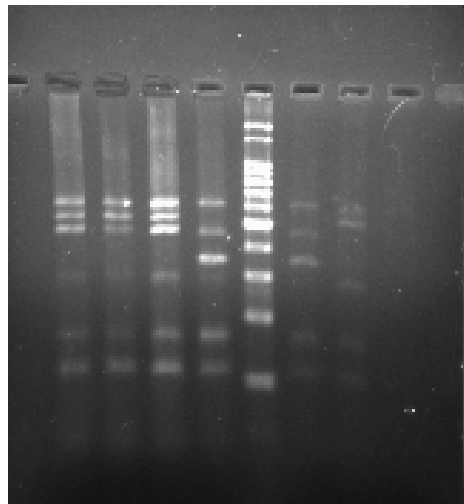
Já, analisando o dendrograma gerado com todos os isolados (Fig. 10) pudemos observar que, com 80 % de similaridade, foi possível dividir os isolados em 9 grupos. Entre o grupo A possui os isolados de colissepticemia, na sua maioria, com exceção de apenas um isolado de celulite. Os isolados de celulite apresentaram o padrão mais diferente, sendo que um deles (PR20) apresentou apenas 55 % de similaridade. Além disso, pudemos ob-

servar que os isolados de colissepticemia e celulite, que foram coletados em diferentes regiões geográficas, demonstraram proximidade filogenética.

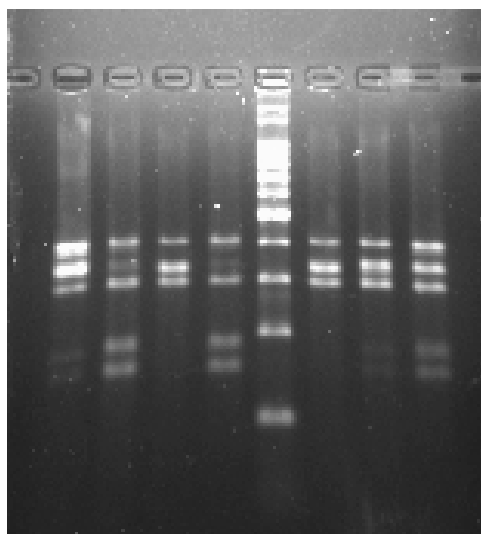
A.



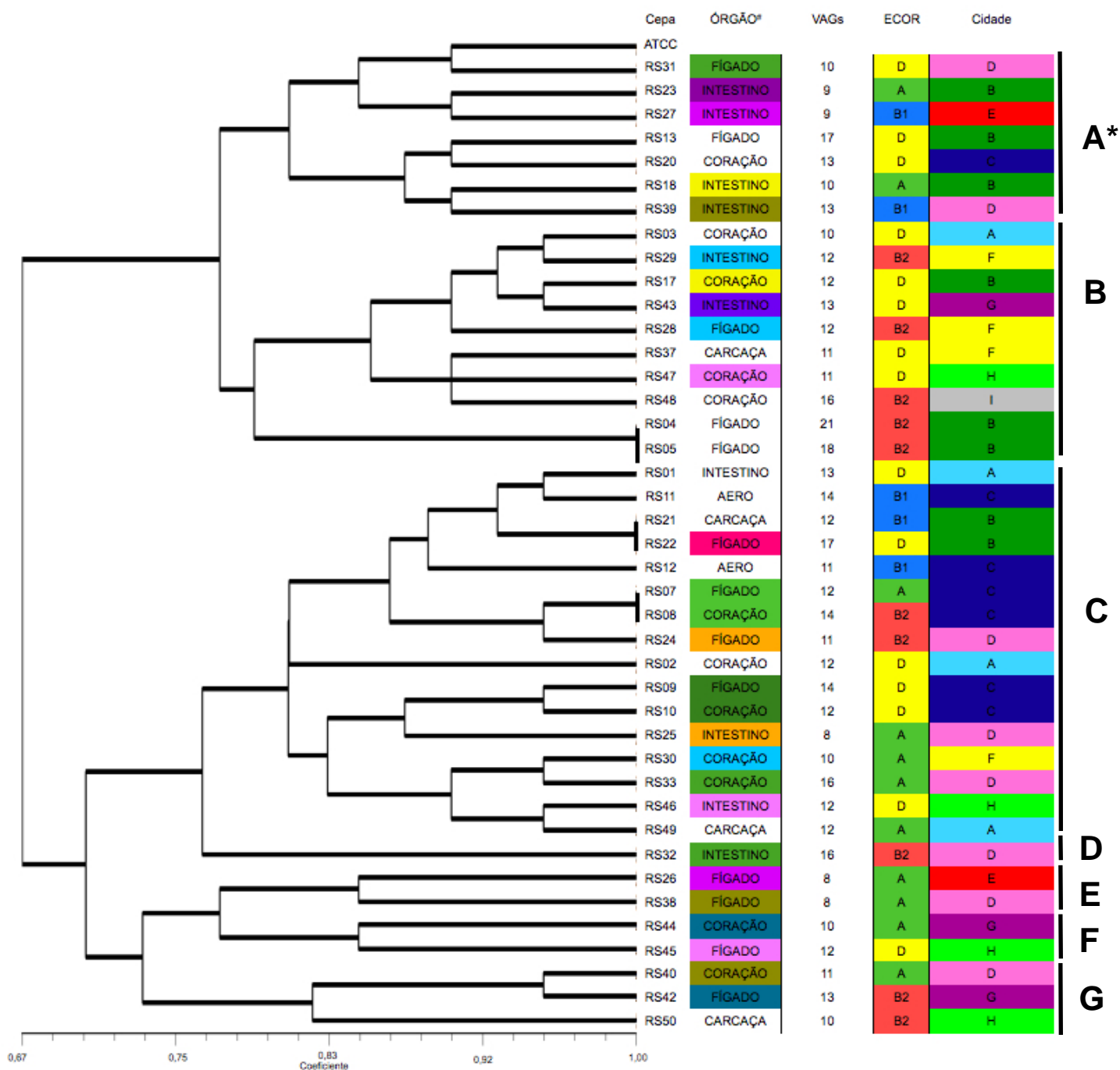
B.



C.



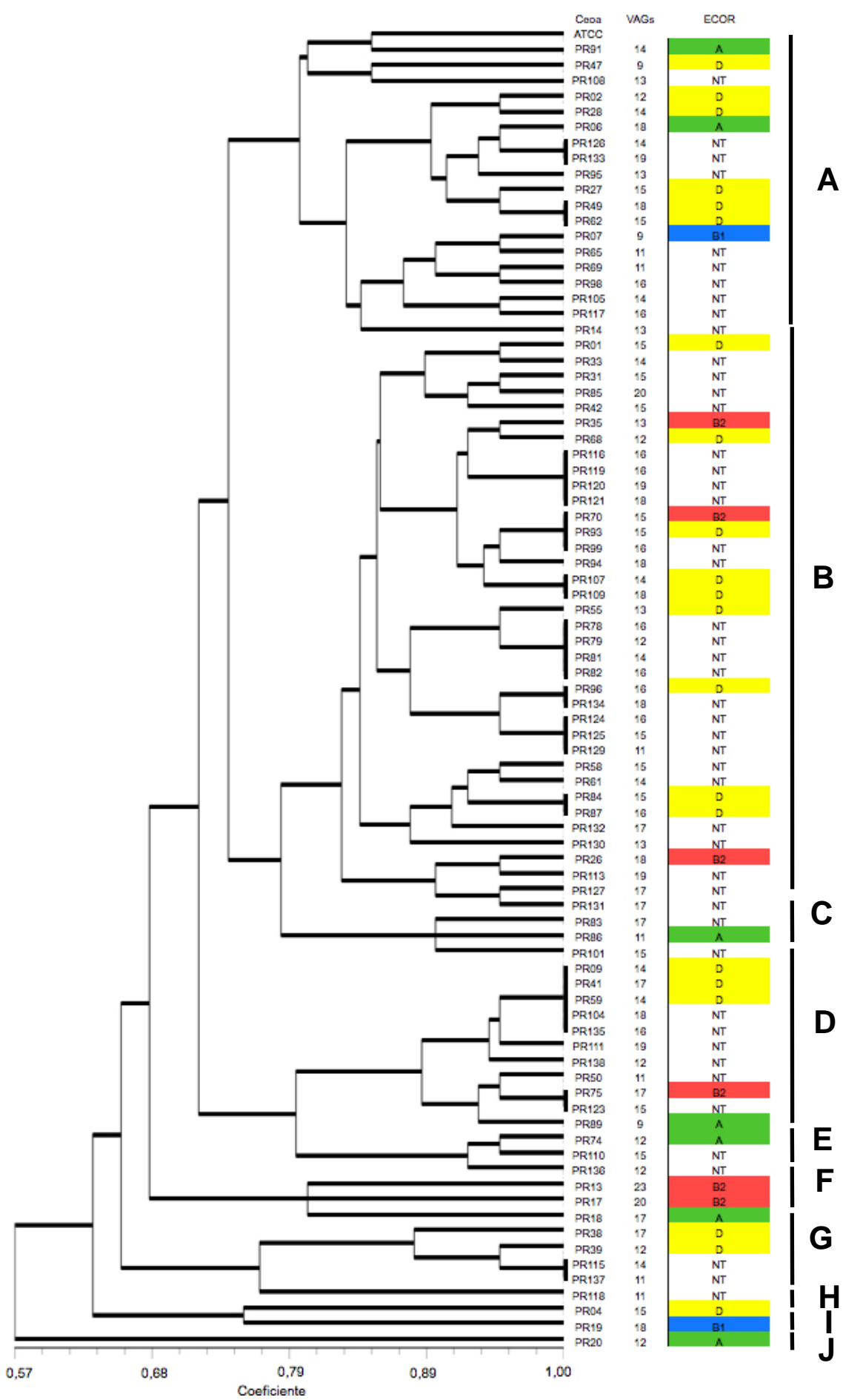
**Figura 7.** Padrão de digestão com as enzimas de restrição. Padrão de digestão com as enzimas *RsaI* (A), *HinfI* (B) e *TaqI* (C).



**Figura. 8.** Dendrograma mostrando a relação Filogenética entre os 41 Isolados de Coli septicemia.

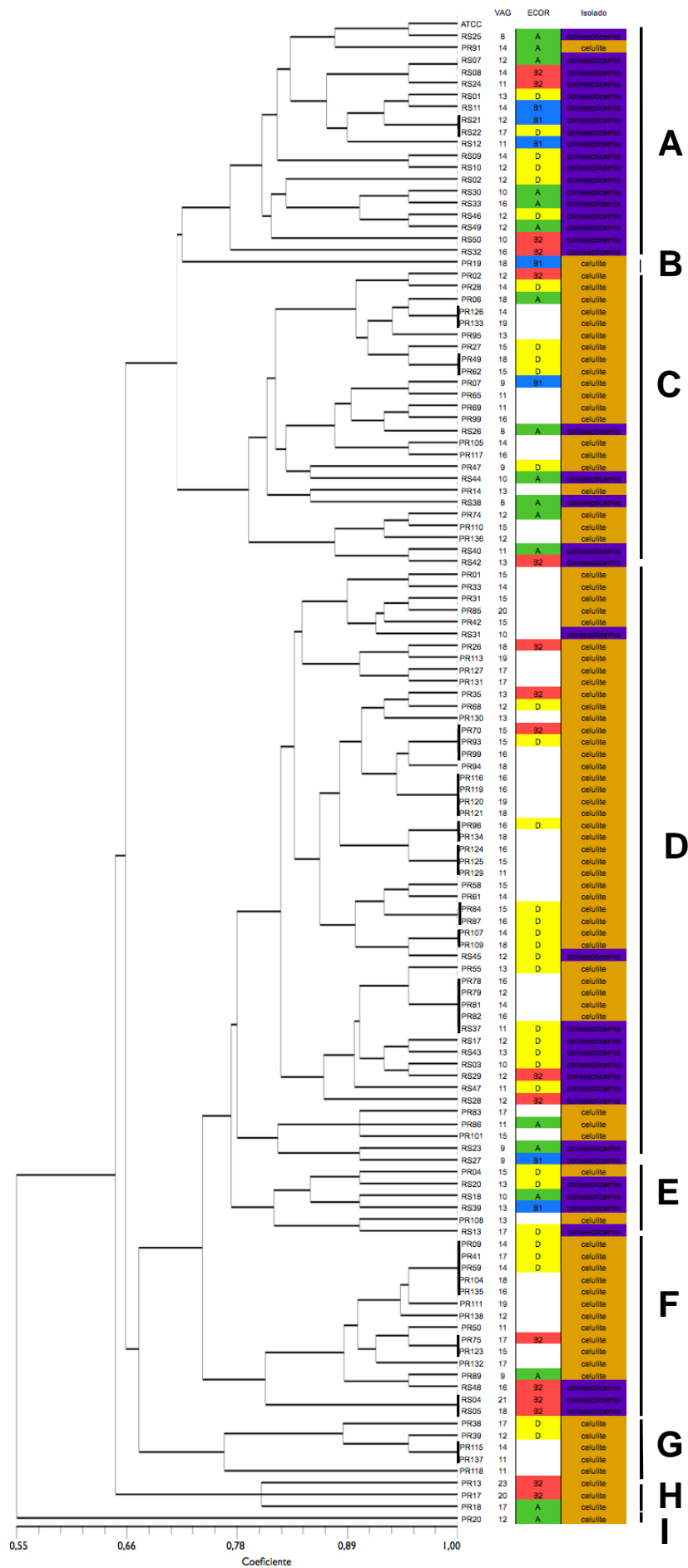
# Órgão: Indica o local de isolamento da cepa APEC da ave acometida por colissepticemia. Cores iguais indicam que as cepas foram isoladas da mesma ave, com exceção das brancas que são cepas diferentes.

\* Indica os grupamentos com 80 % de similaridade



**Figura. 9.** Dendrograma mostrando a relação Filogenética entre os 84 Isolados de Celulite.





**Figura. 10.** Dendrograma mostrando a relação Filogenética entre os 84 Isolados de Celulite e 41 isolados de Colissepticemia.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Agentes Antimicrobianos

Casos de resistência a agentes antimicrobianos em isolados de *E. coli* já foram relatados em todo mundo. No entanto, existem variações nos perfis de resistência de acordo com a região geográfica e com diferenças entre populações (Baum & Marre, 2005).

O uso disseminado de agentes antimicrobianos na medicina veterinária e o uso de promotores de crescimento tem levado à seleção de *E. coli* resistentes a antibióticos na microbiota desses animais (Baum & Marre, 2005). Um dos primeiros estudos sobre a resistência de isolados aviários de *E. coli* a antimicrobianos foi realizado por Sojka *et al.* em 1961. Nesse estudo, foi observado o aumento na proporção de isolados resistentes à tetraciclina entre 1957 a 1960; enquanto que em 1957 apenas 3.7 % dos isolados eram resistentes, em 1960 a proporção aumentou para 63.2 % (Singer & Hofacre, 2006).

No presente estudo, foi avaliado o perfil de resistência de 144 isolados de celulite e 41 isolados de colissepticemia de frangos de corte da região sul do Brasil. Foram observados baixos níveis de resistência aos agentes antimicrobianos, inferiores a 10 % para a maioria dos agentes antimicrobianos, sendo similares aos obtidos por Cormican, *et al.*, na Irlanda (2001) e por Schroeder *et al.* nos Estados Unidos (2002). Tais níveis foram inferiores quando comparados a outros estudos realizados no Brasil (Cardoso *et al.*, 2002; Zanatta *et al.*, 2004; Artencio *et al.*, 2007), e em outros países, como Estados Unidos (Wooley, *et al.*, 1992; Peighambari, *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2005), Canadá (Allan, *et al.*, 1993; Ngeleka *et al.*, 1996), Japão (Asai *et al.*, 2005; Ozawa *et al.*, 2008), Coreia (Kim *et al.*, 2007), China (Yang *et al.*, 2004), Espanha (Blanco, *et al.*, 1997) e Marrocos (Amara *et al.*, 1995).

A maioria dos isolados (68 %) apresentou resistência à tetraciclina, estando de acordo com resultados obtidos por outros grupos (Wooley *et al.*, 1992; Peighambari *et al.*, 1995; Blanco *et al.*, 1997; Cormican *et al.*, 2001; Schroder *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005). A tetraciclina é o agente antimicrobiano mais antigo e mais largamente utilizado (desde a década de 50), testado nesse trabalho. É também um dos agentes antimicrobianos mais frequentemente empregados: primeiramente como aditivo na alimentação, para a promoção do crescimento, e mais recentemente, como um agente para prevenção de infec-

ções. Tais fatores provavelmente conferiram a cepas de *E. coli* resistência a esse agente observada neste e em outros estudos.

A resistência dos isolados de celulite e colissepticemia a sulfonamidas também foi frequente, assim como verificado por Cardoso *et al.* (2002) e Zanatta *et al.* (2004) no Brasil. As sulfonamidas são agentes antimicrobianos utilizados por muito tempo no tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos tanto em humanos quanto em animais. A alta resistência a esse fármaco pode ser justificada pela sua ampla utilização e disponibilidade no mercado.

Em relação à combinação de sulfa e trimetoprima, os isolados apresentaram baixos níveis de resistência, inferiores aos dados obtidos por Blanco *et al.* (1997), Cardoso *et al.* (2002) e Yang *et al.* (2004). Schroeder *et al.* (2002), que concluem que pelo fato de essa associação de fármacos ser amplamente empregada no tratamento de casos de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) em humanos, casos de resistência a esses antimicrobianos devem ser monitorados, a fim de se evitar que essa associação venha a se tornar ineficiente.

Além disso, nossos resultados indicaram que a resistência aos fármacos que atuam na parede celular, como ampicilina, bacitracina, cefalotina e ceftiofur, foi significativamente mais frequente em isolados de colissepticemia (92.7 %) do que em isolados de celulite (29.2 %), sendo que esse resultado não foi observado por nenhum outro trabalho.

Os resultados do presente trabalho são importantes não apenas para a avicultura como também para a medicina humana, devido aos riscos de transferência de bactérias dos animais para humanos. Schroeder *et al.* (2002) detectaram duas amostras de *E. coli* isoladas de humanos resistentes a ceftiofur, uma cefalosporina de espectro estendido de uso exclusivo em tratamento veterinário. Esses pesquisadores, concluíram que pode ocorrer transferência de bactérias resistentes entre animais e humanos. No presente trabalho, 3.5 % dos isolados de celulite e 63.4 % dos de colissepticemia apresentaram resistência a ceftiofur. Sabe-se que pode ocorrer resistência cruzada entre ceftiofur e ampicilina, o justificaria a alta resistência para ceftiofur, visto que este é um fármaco novo e está pouco tempo no mercado (Lee & Maurer, 2000).

No presente estudo, 8.4 % das amostras de celulite e 75.6 % das amostras de colibacilose analisadas foram resistentes à bacitracina. Esse fármaco não foi testado por nenhum outro trabalho disponível na literatura sobre *E. coli* patogênica aviária. A bacitracina foi escolhida pelo fato de ser amplamente utilizada no Brasil como promotor de crescimento e na terapia humana (uso tópico), embora não seja empregada no tratamento de infecções de aves. Como já foi observado por Van den Booard *et al.* (2000), concluímos que o uso de

promotores de crescimento pode selecionar isolados resistentes, não somente os microrganismos patogênicos, mas também entre as bactérias que pertencem à microbiota normal de animais.

Zanata *et al.* (2004) concluíram que o impacto do uso de fármacos na produção avícola, como o enrofloxacino, e o aumento de cepas resistentes a quinolonas e a fluorquinolonas devem continuar sendo monitorados. Blanco *et al.* (1997) também recomendaram que a administração dessa classe de fármacos em aves deve ser prudente, visto que pode ocorrer resistência cruzada com enteropatógenos humanos.

Quase todos os isolados avaliados (85.9 %) apresentaram resistência a pelo menos um agente antimicrobiano testados. No entanto, pouco mais da metade dos isolados de APEC (54.6 %) apresentaram um perfil de resistência a mais de 3 agentes antimicrobianos. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores, que sugerem que as cepas de *E. coli* aviárias são resistentes a mais de um fármaco (Allan *et al.*, 1993; Peighambari *et al.*, 1995; Blanco *et al.*, 1997; Cormican *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2002; Zanatta *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005; Artencio *et al.*, 2007; Ozawa *et al.*, 2008). Ademais, nenhum dos agentes antimicrobianos testados demonstrou eficiência contra todos os isolados de APEC avaliados.

Os maiores níveis de resistência foram observados para os isolados de colissepticemia, sendo que 51 % deles foram resistentes a 5 ou mais agentes antimicrobianos. Nossos resultados contrastam com o observado por Artencio *et al.* (2007), que também estudaram a resistência de agentes antimicrobianos entre isolados de celulite e colissepticemia do Rio Grande do Sul. Eles observaram uma semelhança frente a todos os agentes antimicrobianos em relação à celulite e colissepticemia, com exceção somente do ciprofloxacino.

Vale ressaltar que as amostras avaliadas no presente trabalho foram isoladas de granjas nas quais não eram utilizados agentes antimicrobianos como promotores de crescimento há pelo menos 5 anos. Entretanto, a maioria dos estudos cujos resultados foram usados como parâmetros (Cardoso, *et al.*, 2002; Zanata *et al.*, 2004; Artencio, 2007), avaliaram amostras isoladas de granjas que ainda empregavam agentes antimicrobianos como promotores de crescimento ou como agentes profiláticos.

Os isolados aqui avaliados apresentaram resistências menores, o que é positivo para a melhoria da criação e da saúde, tanto para animais quanto para humanos. Com esse resultado, pode esperar-se que os índices de resistência diminuam ainda mais, contribuindo para a melhoria da qualidade da avicultura. Visto que nossos resultados já são inferiores a

outros trabalhos realizados no Brasil (Cardoso, *et al.*, 2002; Zanata *et al.*, 2004; Artencio, 2007).

## **5.2 Prevalência dos Fatores Associados a Virulência**

Existem muitos fatores associados à virulência de *E. coli* patogênica aviária descritos, porém ainda não foi possível definir as características do patógeno causador da colibacilose aviária. É possível que existam muitos patótipos de *E. coli* causadores de infecções aviárias (Rodrigues-Siek *et al.*, 2005), já que essas podem se apresentar como infecções localizadas (por exemplo, celulite) ou sistêmicas (colissepticemia) (Barnes & Gross, 1997).

Os resultados do presente estudo mostram que cepas de *E. coli* aviárias apresentam pelo menos um fator de virulência relacionado à adesão, um relacionado ao sistema de aquisição de ferro e um fator de resistência ao soro (Tabela 3). Esses dados estão de acordo com estudos anteriores, que sugerem que cepas APEC devem apresentar pelo menos um fator de cada grupo para serem capazes de causar colibacilose (Janßemet *et al.*, 2001; Ngeleka *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2003; Delicato *et al.*, 2003; Rodrigues-Siek *et al.*, 2005; Ewers *et al.*, 2007).

Os fatores de virulência mais prevalentes foram *fimC*, *ompA*, *crlA* and *traT*, presentes em quase todos os isolados (com prevalência maior do que 87,5 %) (Tabela 3), corroborando resultados de estudos anteriores (Rodrigues-Siek *et al.*, 2005; Ewers *et al.*, 2007).

Foi detectada uma média de 14.6 fatores associados à virulência para os isolados de celulite, e 12.3 para os isolados de colissepticemia, dentre os 33 VAGs testados (Ngeleka *et al.*, 1996; Jeffrey *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2003). A maioria dos isolados que apresentou mais de 15 fatores associados a virulência (36 %) pertence ao grupo de isolados de celulite. Se a virulência de APEC é reflexo do número de VAGs, os isolados de celulite testados neste trabalho são mais virulentos do que os de colissepticemia, assim como já foi observado por outros grupos (Jeffrey *et al.*, 2002; Rodrigues-Siek *et al.*, 2005). Obviamente, essa diferença não é suficiente para a diferenciação de patótipos, mesmo porque uma infecção localizada pode progredir para uma infecção sistêmica, afetando os órgãos internos da ave (Gomis, *et al.*, 2001).

Alguns trabalhos observaram que, com a deleção de alguns fatores associados à virulência, como *ibeA* (Germon *et al.*, 2005), *tsh* (Dozois *et al.*, 2000), cápsula K1 e *fim* (Mellata *et al.*, 2003) e fimbria do tipo P (Stordeur *et al.*, 2002) em isolados virulentos, a lesão no hospedeiro foi reduzida, porém não houve impedimento em relação ao estabelecimento da doença. Com base nesses resultados, sugerimos que a virulência de isolados APEC resulta de uma soma de fatores, de forma que um isolado com maior número de fatores associados à virulência apresenta chances maiores de ser mais virulento e causar infecções mais severas ao hospedeiro.

Os genes presentes nos plasmídeos de Colicina V (ColV) (*cvi/cva*, *iroN*, *iss*, *iucD*, *sitD*, *traT*, *tsh*) ocorrem na maioria dos 185 isolados testados. A presença de grandes plasmídeos está fortemente associada à virulência de isolados de colibacilose, sendo um fator importante para o desenvolvimento da infecção em aves. Outros estudos já demonstraram que os grandes plasmídeos de Colicina V são mais frequentes em isolados de APEC do que em isolados de *E. coli* comensais (AFEC) (Rogrigues-Siek *et al.*, 2005).

A adesão de APEC aos epitélios é importante para a colonização do hospedeiro e um passo determinante para o início da infecção. De fato, todos os isolados de APEC analisados nesse estudo apresentaram fatores relacionados à adesão, com uma média de 4 adesinas por isolado. A redundância pode ser justificada pela hipótese de que cada adesina é importante em uma determinada etapa do processo de infecção. Já foi descrito que a fimbria do tipo 1 seria importante nos estágios iniciais da infecção, enquanto que a fimbria P seria importante na colonização dos órgãos internos (Pourbakhsh *et al.*, 1997b).

Os genes envolvidos na captação de ferro, amplamente distribuídos entre isolados de celulite e colissepticemia (Rogrigues-Siek *et al.*, 2005; Ewers *et al.*, 2007), foram detectados em todos os isolados, com uma média de 4 sideróforos por isolado. Essa aparente redundância nos sistemas sideróforos ilustra a importância da captação de ferro para a patogênese na colibacilose aviária, visto que o desenvolvimento e a multiplicação bacteriana requerem concentrações de ferro 2 ordens de magnitude maiores do que as encontradas nos fluidos biológicos.

Em todos os isolados foi encontrado pelo menos um dos fatores relacionados à resistência ao soro, de grande importância para a manutenção da bactéria no hospedeiro. Uma média de 3.7 fatores foi encontrada em cada isolado. A resistência ao soro pela bactéria está bem descrita e tem sido relacionada à patogênese; é conferida por uma conjunção de fatores, combinando efeitos do LPS (lipopolissacarídeo), produção de aerobactina, cápsula, antígeno O e proteínas de membrana (Wooley *et al.*, 1992; La Ragione & Woodward, 2002).

Esses fatores auxiliam na permanência da bactéria no hospedeiro, impedindo que ela seja destruída pelos sistemas de defesa, embora esse processo ainda não esteja completamente elucidado.

Fatores que atuam no processo de invasão celular podem ser importantes para APEC. Trinta e cinco por cento dos isolados possuíram pelo menos uma das três invasinas testadas nesse estudo. Esse número pode parecer inferior ao esperado, visto que em 63,4 % dos isolados de infecções sistêmicas não foi detectada a presença de fatores associados à invasão. Porém, não é possível determinar se esses isolados apresentam outras invasinas que não as testadas, ou se essas cepas APEC atravessam as barreiras do epitélio do hospedeiro através de outro mecanismo.

Foi observada associação significativa entre os fatores de virulência *sfa/foc* e *malX*; *iha* e *neuC*; *gimB* e *sfa/foc*; *tia* e *papC*. Essas mesmas associações foram observadas por Ewers *et al.* (2007), porém ainda não se sabe da importância dessa relação no desenvolvimento da doença.

Ewers *et al.* (2005) propuseram que *E. coli* obtidas de isolados de aves doentes fossem consideradas patogênicas aviárias (APEC) se apresentassem pelo menos quatro de oito principais genes de virulência (*papC*, *iucD*, *irp2*, *tsh*, *vat*, *astA*, *iss* e *cvi/cva*). Em nosso estudo, 58.5 % dos isolados de colissepticemia e 78.5 % dos isolados de celulite apresentaram quatro ou mais desses fatores, sendo portanto consideradas APEC de acordo com o proposto por Ewers *et al.* (2005).

As cepas de *E. coli* causadoras de celulite aviária possuem fatores de virulência similares aos encontrados nas causadoras de infecções generalizadas (Ngeleka *et al.*, 1996; Brito *et al.*, 2003). Isso sugere que uma mesma cepa de *E. coli* pode ser capaz de causar tanto infecção localizada quanto sistêmica. Nesses casos, o que definiria o tipo de infecção seria a via de entrada da bactéria no hospedeiro. Pelo fato de nenhum dos fatores de virulência já identificados ter sido capaz de distinguir uma cepa patogênica de uma não patogênica (Barnes & Gross, 1997), não é possível definir, apenas com base no perfil de VAGs, quais são os isolados mais patogênicos, a menos que sejam realizados testes de infecção *in vivo* (com pintos de 1 dia ou em galinhas de 5 semanas).

Nossos resultados, assim como os obtidos por outros estudos, também realizados no Brasil (Delicato *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2003), mostram um panorama da prevalência de fatores de virulência associados a APEC, indicando que as cepas encontradas aqui não são diferentes no perfil de VAGs das cepas encontradas na Alemanha (Janßemet *et al.*, 2001; Ewers, *et al.*, 2007), no Canadá (Ngeleka *et al.*, 2002), na China (Zhao, *et al.*, 2009), no Ja-

pão (Yaguchi, *et al.*, 2007) e nos Estados Unidos (Rodrigues-Siek *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2008) indicando que isolados APEC são similares em todo mundo.

Como demonstrado por estudos anteriores, alguns isolados de APEC são mais próximos geneticamente de isolados de ExPEC humanas (Moulin-Schouleur *et al.*, 2006; Mokady *et al.*, 2005, Ewers *et al.*, 2007). Isso sugere que as aves possam ser um veículo ou pelo menos um reservatório de *E. coli* capazes de causar infecções urinárias (UPEC) e meningite do recém-nascido (NMEC). Por isso, APEC deve ser considerada um agente zoonótico em potencial.

### **5.3 Tipagem Filogenética**

Estudos de análises filogenéticas mostraram que podemos dividir os isolados de *E. coli* em em 4 grupos filogenéticos principais (A, B1, B2 e D). Nos grupo B2, predominam os isolados que causam infecções extra-intestinais e menos frequentemente no grupo D. No grupo B1 predominam os isolados patogênicos animais, já no grupo A, predominam os isolados comensais (Herzer *et al.*, 1990; Clermont *et al.*, 2000).

Ao analisar os resultados da tipagem para isolados de celulite e de colissepticemia do presente estudo, podemos observar que a maioria dos isolados de APEC foram classificadas como pertencentes ao grupo D (Tabela 4).

Mais de 60 % dos isolados de celulite foram classificados no grupo D. Os isolados de colissepticemia apresentaram uma classificação mais distribuída: 36 % classificados como do grupos D, 26.8 % do grupo A e 24.4 % do grupo B2.

Nossos resultados diferem de estudos anteriores sobre APEC realizados nos Estados Unidos (Rodrigues-Siek *et al.*, 2005; Johnson, *et al.*, 2006; Johnson, *et al.*, 2008 ), na China (Zhao, *et al.*, 2009) e na Alemanha (Ewers *et al.*, 2007), segundo os quais os isolados APEC foram mais associados ao grupo A; e na França (Moulin-Schouleur *et al.*, 2006) em que a maioria dos isolados foi classificada como pertencente ao grupo B2.

Herzer *et al.* (1990) propuseram que o grupo B1 seria composto por isolados patogênicos provenientes de animais. No entanto, em todos os trabalhos sobre APEC (Johnson, *et al.*, 2004; Moulin-Schouleur *et al.*, 2006; Ewers *et al.*, 2007; Johnson, *et al.*, 2008; Zhao, *et al.*



*al.*, 2009), assim como no presente trabalho, observa-se que menos de 10 % dos isolados pertencem ao grupo B1.

Com base nesses resultados, pode-se inferir que não existe um grupo que compreenda exclusivamente isolados patogênicos animais, mas que os grupos apresentam combinações de isolados comensais e isolados patogênicos animais e humanos, justificando a hipótese de que APEC deve ser considerada um agente zoonótico em potencial.

#### **5.4 Análise Filogenética**

O estudo da diversidade intra-espécie é importante para analisar as semelhanças entre os isolados. Como não existe um patotipo completamente definido para isolados APEC, uma das maneiras de correlacionar isolados é através de análises filogenéticas.

Diferentes métodos já foram utilizados para realizar a análise filogenética de isolados APEC, como eletroforese de campo pulsado (PFGE) (Kawano *et al.* 2006), amplificação aleatória do DNA polifórmico (RAPD) (Singer *et al.*, 2000) e, a análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA) (García-Martínez *et al.*, 1996b), utilizada nesse trabalho.

Entre os isolados de colisepticemia (Fig. 7), foi observada uma proximidade filogenética maior do que 67 %, sendo possível separá-los em 7 grupos. Foi identificado um grupo (B) no qual estão presentes os isolados mais virulentos e pertencentes aos grupos ECOR B2 e D, associados aos isolados patogênicos extra-intestinais.

Foi verificada a presença de cepas diferentes isoladas de uma mesma ave, como as encontradas nos isolados RS45, RS46 e RS47, provenientes do fígado, intestino e coração, respectivamente. Isso significa que a infecção pode ser provocada por uma combinação de bactérias.

Foram observados, no presente estudo, perfis iguais para isolados de aves diferentes. Os isolados RS04 e RS05, por exemplo, apresentaram o mesmo perfil por ARDRA, o que indica que são a mesma cepa isolada de duas aves, já que ambas amostras foram provenientes da mesma granja.

Analisando o dendograma gerado com os isolados de celulite (Fig. 8), foi possível separá-los em 10 grupos. O grupo B compreende os isolados mais virulentos e pertencentes aos grupos ECOR B2 e D. A análise do total dos isolados de APEC (Fig. 9) permitiu a

sua separação em 9 grupos. O grupo A foi formado, à exceção de apenas um, por isolados de colissepticemia. Os isolados de celulite apresentaram o padrão filogenético mais distante, tendo um deles (PR20) apresentado apenas 55 % de similaridade.

Alguns isolados de celulite e de colissepticemia apresentaram perfis filogenéticos iguais, porém fatores associados à virulência diferentes. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de existir a possibilidade de transferência horizontal de material genético (Philippe *et al.*, 2003). A análise filogenética é feita com o material presente na região do espaçamento intergênico na região 16S-23S do DNA ribossômico, uma região bem conservada do cromossomo bacteriano, ao passo que alguns dos fatores associados à virulência estudados nesse trabalho, estão presentes em elementos móveis, como plasmídeos, que podem ser transferidos sem que ocorram alterações no cromossomo, o que justificaria o resultado obtido.

Com base em nossos resultados para isolados de colissepticemia e de celulite, não podemos afirmar que existam clones localizados em uma mesma região geográfica, visto que os isolados, mesmo provenientes de uma mesma localidade, apresentaram padrões diferentes, ou seja esse resultado difere do que foi obtido em outros estudos (Singer *et al.*, 2000), em que foram encontradas populações semelhantes em uma mesma região.

Não foi possível separar os isolados de acordo com o órgão de que foram obtidos, o que indica que existe uma grande variedade de patótipos e que nenhum deles é exclusivo para infecção de um órgão específico. Ademais, a presença de fatores associados à virulência e a classificação nos grupos ECOR, por si só, também não foram suficientes para indicar a diferença entre os grupos. De modo geral, também não foi possível observar diferença entre os isolados de celulite e os de colissepticemia obtidos de duas regiões diferentes (Paraná e Rio Grande do Sul). Isso indica que os isolados aqui avaliados apresentam certa proximidade filogenética, o que evidencia a ampla distribuição destes nas duas regiões e indica a ausência de clones endêmicos e específicos para uma região.

Com os resultados obtidos nesse estudo, podemos concluir que não existe um padrão filogenético que determine que um isolado seja de celulite ou de colissepticemia, e que a proximidade geográfica não foi determinante da aproximação filogeneticamente dos isolados.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com o presente trabalho mostraram o perfil de resistência aos agentes antimicrobianos, a prevalência dos fatores de virulência e dos grupos ECOR e a análise filogenética encontrados nos isolados de *E. coli* patogênica aviária de lesões severas de celulite e de infecção sistêmica. Esses resultados fornecem um panorama geral dos perfis de suscetibilidade, virulência e filogenia encontrados na região sul do Brasil.

O tratamento com antimicrobianos é uma das formas de diminuir o impacto da colibacilose, mas a emergência e a disseminação de resistência antimicrobiana em amostras de *E. coli* pode complicar os tratamentos das infecções em animais e humanos. Nosso trabalho fornece dados sobre a situação de resistência entre APEC. Além disso, essas análises podem servir para o monitoramento e medidas preventivas contra a disseminação de APEC nos estágios iniciais da doença.

As cepas de *E. coli* que causam celulite aviária apresentaram fatores de virulência similares aos encontrados nas cepas *E. coli* que causam infecções generalizadas em aves. Isso sugere que a mesma cepa de *E. coli* possa ser capaz de causar tanto lesões de celulite quanto doenças sistêmicas, dependendo somente da via de entrada da bactéria no seu hospedeiro. Como nenhum dos fatores de virulência identificados até o presente momento foi capaz de distinguir uma cepa patogênica de uma cepa não patogênica (Barnes & Gross, 1997), não é possível distinguir dentre os isolados quais são os mais patogênicos, a menos que sejam realizados testes de infecção *in vivo* (com pintos de 1 dia ou em galinhas de 5 semanas), que indicariam então as cepas mais virulentas.

A análise filogenética indicou que os isolados de APEC aqui avaliados apresentam proximidade filogenética, o que evidencia a ampla distribuição destes nas duas regiões (Paraná e Rio Grande do Sul) e indica a ausência de clones endêmicos e específicos para uma região específica. Esses resultados indicam, que são necessárias maiores medidas de profilaxia e controle da disseminação dos agentes infectantes.

## 6.1 Principais conclusões

Com os resultados obtidos no presente trabalho, pudemos concluir que:

1. Os níveis de resistência aos agentes antimicrobianos foram considerados baixos, com exceção a tetraciclina e sulfonamidas para isolados de celulite; e os agentes que atuam na parede celular para colissepticemia.

2. Todos os isolados de *E. coli* aviárias apresentam pelo menos um fator de virulência relacionado à adesão, um relacionado ao sistema de aquisição de ferro e um fator de resistência ao soro.

3. Não foi encontrada diferença entre o perfil de fatores associados a virulência entre os isolados de celulite e colissepticemia.

4. A maioria dos isolados de celulite e de colissepticemia foram classificadas como pertencentes ao grupo filogenético D.

5. Não existe um padrão filogenético que determine que um isolado seja de celulite ou que colissepticemia.

6. A proximidade geográfica não foi determinante da aproximação filogeneticamente dos isolados.

Como o controle da colibacilose depende de vários fatores, a prevalência da colibacilose poderia ser diminuída através de maiores cuidados no ambiente de criação das aves, e de uma associação entre manejo eficiente e desinfecção dos galpões de criação (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Ferreira & Knöbl, 2000). Assim como foi sugerido por Ewers *et al.*, 2007, as cepas de APEC possuem um elevado potencial zoonótico, pois podem ser isoladas de carne de frangos e seus derivados, as quais se assemelham às cepas isoladas de Ex-PEC humanas (Johnson & Russo, 2005). Por isso devemos garantir que a carne de frango e seus derivados cheguem ao consumidor sem apresentar risco para a saúde pública. Cabe às instituições governamentais um controle frequente desde a produção até o consumidor, uma revisão e ordenamento sobre o uso dos antimicrobianos na produção de frango de corte, a garantia da não utilização de antimicrobianos utilizados em humanos na produção de frango e, o desenvolvimento de ações de monitoramento de resíduos e resistência a antimicrobianos correlacionados ao consumo da carne de frango e seus derivados.

## REFERÊNCIAS

- ALLAN, B. J., VAN DER HURK, J. & POTTER, A. A. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. *Canadian Journal Veterinary Research*, 57: 146-151, 1993.
- AMARA, A., ZIANI, Z. & BOUZOUBAA, K. Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis. *Veterinary Microbiology*, 43: 325-330, 1995.
- ANTÃO, E.M., WIELER, L. H. & EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*, 1 (22): 1-12, 2009.
- ANTÓN, A. I., MARTÍNEZ-MURCIA A. & RODRÍGUEZ-VALERA F. Sequence diversity in the 16S–23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons in representatives of the *Escherichia coli* ECOR collection. *Journal of Molecular Evolution*, 47: 62–72, 1998.
- ARNÉ, P., MARC, D., BREE, A., SCHOULER, C. & DHO-MOULIN, M. Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of Avian Pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a *fimH* deletion. *Avian Diseases*, 44: 343-355, 2000.
- ARRECUBIETA, C., HAMMARTON, T. C., BARRETT, B., CHAREONSUDJAI, S., HODSON, N., RAINEY, D. & ROBERTS, I. S. The transport of group 2 capsular polysaccharides across the periplasmic space in *Escherichia coli*. Roles for the *KpsE* and *KpsD* proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 4245-4250, 2001.
- ARTENCIO, J. O. Perfil de resistência a antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária isoladas no estado do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- ASAI, T., KOJIMA, A., HARADA, K., ISHIHARA, K., TAKAHASHI, T. & TAMURA, Y. Correlation between the usage volume of veterinary therapeutic antimicrobials and resistance in *Escherichia coli* isolated from the feces of food-producing animals in Japan. *Japanese Journal of Infection Diseases*, 58: 369-372, 2005.
- BARNES, H.J. & GROSS, W.B., Colibacillosis. In: CALNEK, B.W. *Disease of Poultry*. 10. ed. Ames:Iowa state university press. p.131-141,1997.
- BAUM, H. & MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *International Journal of Medical Microbiology*, 295: 503-511, 2005.
- BINNS, M. M., DAVIES, D. L. & HARDY, K. G. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature*, 279: 778-781, 1979.

BLANCO, J. E., BLANCO, M., MORA, A. & BLANCO, J. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(8): 2184-2185, 1997.

BONACORSI, S., CLERMONT, O., HOUDOUIN, V., CORDEVANT, C., BRAHIMI, N., MARECAT, A., TISLEY, C., NASSIF, X., LANGE, M. & BINGEN, E. Molecular analysis and experimental virulence of French and North American *Escherichia coli* neonatal meningitis isolates: identification of a new virulent clone. *The Journal of Infectious Diseases*, 187: 1895-1906, 2002.

BOUCHERT V., HUOT, H. & GOLDSTEIN, R. Molecular genetic basis of ribotyping. *Clinical Microbiology Reviews*, 21 (2): 262–273, 2008.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 04 fev 2010.

BRASIL. Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998. Aprova o regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1998.

BRÉE, A., DHO, M. & LAFONT, J. P. Comparative infectivity for axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. *Avian Diseases*, 33: 134-139, 1989.

BRITO, B. G., GAZIRI, L. C. J. & VIDOTTO, M. C. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infection and Immunity*, 71 (7): 4175-4177, 2003.

BRITO, B. G., TAMEHIRO, C. Y., OKAMO, M. M. L., BERBEL, M. M. & GUIMARÃES, I. G. Cervical cellulitis in broiler chickens for *Escherichia coli*. *Ciências Agrárias*, Londrina, 23 (1): 81-84, 2002.

CARDOSO, A. L. S. P., TESSARI, E. N. C., CASTRO, A. G. M. & ZANATA, G. F. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. *Arquivos do Instituto de Biologia*, 69 (2): 1-5, 2002.

CLERMONT, O., BONACORSI, S. & BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4555-4558, 2000.

CORMICAN, M., BUCKLEY, V., CORBETT-FEENEY, G. & SHERIDAN, F. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from turkeys and hens in Ireland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 587-595, 2001.

DELICATO, E. R., BRITO, B. G., GAZIRI, L. & VIDOTTO, M. C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis *Veterinary Microbiology*, 94: 97-103, 2003.

DE RYCKE, J., MILON, A. & OSWALD, E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Veterinary Research*, 2 (3): 221-33, 1999.

DHO-MOULIN, M. & FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, 30: 299-316, 1999.

DOZOIS, C. M., DAIGLE, F. & CURTISS, R. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *PNAS*, 100 (1): 247-252, 2003.

DOZOIS, C. M., DHO-MOULIN, M., BRÉE, A., FAIRBROTHER, J. M., DESAUTELS, C. & CURTISS, R. Relationship between the *Tsh* autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infection and Immunity*, 68 (7):4145-4154, 2000.

DWARS, R. M., MATTHIJS, M. G. R., DAEMEN, A. J. J. M., VAN ECK, J. H. H., VERVELDE, L. & LANDMAN, W. J. M. Progression of lesions in the respiratory tract of broilers after single infection with *Escherichia coli* compared to superinfection with *E. coli* after infection with infectious bronchitis virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127: 65-76, 2009.

DZIVA, F. & STEVENS, M.P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology*, 37 (4): 355-366, 2008.

EWERS, C., JANSSEN, T., KIESSLING, S., PHILIPP, H. C. & WIELER, L. H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology*, 104: 91-101, 2004.

EWERS, C., JANSSEN, T., KIESSLING, S., PHILIPP, H. C. & WIELER, L. H. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 49: 269-273, 2005.

EWERS, C., LI, G., WILKING, H., KIESSLING, S., ALT, K., ANTAO, E. M., LANTURNUS, C., DIEHL, I., GLODDE, S., HOMEIER, T., BOHNKE, U., STEINRUCK, H., PHILIPP, H. C. & WIELER, L. H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*, 297 (3):163-176, 2007.

EWERS, C., ANTÃO, E. M., DIEHL, I., PHILIPP, H. C. & WIELER, L. H. Intestine and environment of the chicken as a reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potencial. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (1): 184-192, 2009.

FALKOW, S., Bacterial Entry into Eukaryotic Cells. *Cell*, 65: 1099-1102, 1991.

FALLAVENA, L. C. B., MORAES, H. L. S., SALLE, C. T. P., SILVA, A. B., VARGAS, R. S., NASCIMENTO, V. P. & CANAL, C. W. Diagnosis of skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses – a microscopic and macroscopic study. *Avian Pathology*, 29: 555-562, 2000.

FERREIRA, A. J. & KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI, A., MACARI, M., Doenças das Aves. Campinas: FACTA, p. 197-205, 2000.

FINLAY, B. B. & FALKOW, S., Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (2): 136-169, 1997.

FLECKENSTEIN, J. M., KOPECKO, D. J., WARREN, R. L. & ELSINGHORST, E. A. Molecular characterization of the tia invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 64: 2256-2265, 1996.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J., MARTÍNEZ-MURCIA A. & RODRÍGUEZ-VALERA F., ZORRAQUINO A. Molecular evidence supporting the existence of two major groups in uropathogenic *Escherichia coli*, *FEMS immunology and medical microbiology*. 14: 231- 244, 1996a.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J., MARTÍNEZ-MURCIA, A., ANTÓN, A. I. & VALERA, F. R. Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 178 (21): 6374-6377, 1996b.

GERMON, P., CHEN, Y., HE, L., BLANCO, J. E., BRÉE, A., SCHOULER, C., HUANG, S. & MOULIN-SCHOULEUR, M. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 151: 1179-1186, 2005.

GINNS, C. A., BENHAM, M. L., ADAMS, L. M., WHITHEAR, K. G., BETTELHEIM, K. A., CRABB, B. S. & BROWNING, G. F. Colonization of the respiratory tract by a virulent strain of avian *Escherichia coli* requires carriage of a conjugative plasmid. *Infection and Immunity*, 68: 1535-1541, 2000.

GOMIS, S. M., GOODHOPE, R., KUMOR, L., CADDY, N., RIDDELL, C., POTTER, A. A. & ALLAN, B. J. Isolation of *Escherichia coli* from cellulitis and other lesions of the same bird in broilers at slaughter. *The Canadian Veterinary Journal*, 38 (3): 159-62, 1997a.



GOMIS, S. M., WATTS, T., RIDDELL, C., POTTER, A. A. & ALLAN, B. J. Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. *Avian Diseases*, 41: 234-240, 1997b.

GOMIS, S. M., RIDDELL, C., POTTER, A. & ALLAN, B. J. Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 65: 1-6, 2001.

GOPHNA, U., BARLEV, M., SEIJFFERS, R., OELSCHLAGER, T. A., HACKER, J. & RON, E. Z. Curli Fibers Mediate Internalization of *Escherichia coli* by Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, 69 (4): 2659–2665, 2001.

GUYER, D. M., HENDERSON, I., R., NATARO, J. P. & MOBLEY, H. L. T. Identification of *Sat*, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 38 (1): 53-66, 2000.

GYLES, C. L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal Health Research Reviews*, 9 (2): 149-158, 2008.

HACKER, J., KESTLER, H., HOSCHUTZKY, H., JANN, K. LOTTSPREICH, F. & KORHONEN, T. K. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. *Infection and Immunity*, 61: 544-550, 1993.

HEIMER, S. R., RASKO, D. A., LOCKATELL, C. V., JOHNSON, D. E. & MPBLEY, H. L. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 72: 593-597, 2004.

HERZER, P. J., INOUE, S., INOUE, M. & WHITTAM, T. S. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172 (11): 6175-6181, 1990.

JANßEN, T., SCHWARZ, C., PREIKSCHAT, P., VOSS, M., PHILIPP, H. C. & WIELER, L. H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal of Medical Microbiology*, 291: 371-378, 2001.

JEFFREY, J. S., NOLAN, L. K., TONOOKA, K. H., WOLFE, S., GIDDINGS, W., HORNE, S. M., FOLEY, S. L., LYNNE, A. M., EBERT, J. O., ELIJAH, L. M., BJORKLUND, G., PFAFF-McDONOUGH, S. J., SINGER, R. S. & DOETKOTT, C. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Diseases*, 46: 48–52, 2002.

JOHNSON, J. R. & RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295: 383-404 2005.

JOHNSON, J. R., KUSKOWSKI, M. A., SMITH, K., O'BRIAN, T. T. & TATINI, S. Antimicrobial-resistant and Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *The Journal of Infection Diseases*, 191: 1040-1049, 2005b.

JOHNSON, T. J., KARIYAWASAM, S., WANNEMUEHLER, Y., MANGIAMELE, P., JOHNSON, S. J., DOETKOTT, C., SKYBERG, J. A., LYNNE, A. M., JOHNSON, J. R. & NOLAN, L. K. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *Journal of Bacteriology*, 189 (8): 3228-3236, 2007.

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

JOHNSON, T. J., WANNEMUEHLER, Y., DOETKOTT, C., JOHNSON, S. J., ROSENBERGER, S. C. & NOLAN, L. K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (12): 3987-3996, 2008.

JOHNSON, T. J., SIEK, K. E., JOHNSON, S. J. & NOLAN, L. K. DNA sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic *Escherichia coli* transmissible R plasmid. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 49: 4681-4688, 2005a.

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

KAPER, J. B., NATARO, J. P. & MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*, 2: 123-140, 2004.

KAWANO, M., YAGUCHI, K. & OSAWA, R. Genotypic analyses of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis and apparently healthy chickens in Japan. *Microbiology Immunology*, 50 (12): 961-966, 2006.

KELLER, R., ORDÍÑEZ, J. G., OLIVEIRA, R. R., TRABULSI, L. R., BALDWIN, T. J. & KNUTTON, S. *Afa*, a diffuse adherence fibrillar adhesin associated with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 70(52002): 2681-2689, 2002.

KIRBY, W. M., BAUER, A. W., SHERRIS, J. C. & TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496, 1966.

KIM, K. S. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteremia to neuronal injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 4: 376-385, 2003.

KIM, T. E., JEONG, Y. W., CHO, S. H., KIM, S. J. & KWON, H. J. Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korean avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (10): 3309-3315, 2007.

KOBAYASHI, R. K., GAZIRI, L. C., VENANCIO, E. J. & VIDOTTO, M. C. Detection of Tsh protein mucinolytic activity by SDS-PAGE. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 654-655, 2007.

LA RAGIONE, R. M. & WOODWARD, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticemia. *Research in Veterinary Science*, 73: 27-35, 2002.

LECLERC, B., FAIRBROTHER, J. M., BOULIANNE, M. & MESSIER, S. Evaluation of the adhesive capacity of *Escherichia coli* isolates associated with avian cellulitis. *Avian Diseases*, 47: 21-31, 2003.

LEE, M. D. & MAURER, J. J. The genetic basis for emerging antibiotic resistance in veterinary pathogens. *Annals New York Academy of Science*, 916: 643-645, 2000.

LI, G., LATURNUS, C., EWERS, C. & WIELER, L. H. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infection and Immunity*, 73: 2818-2827, 2005.

MAURER, J. J., LEE, M. D., LOBSINGER, C., BROWN, T., MAIER, M. & THAYER, S. G. Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Avian Diseases*, 42: 431-451, 1998.

MELLATA, M., DHO-MOULIN, M., DOZOIS, C. M., CURTIS III, R., LEHOUX, B. & FAIRBROTHER, J. M. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infection and Immunity* 71: 494-503, 2003.

MELLATA, M., TOUCHMAN, J.W. & CURTISS III, R. Full sequence and comparative analysis of the plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic *E. coli* x7122 (O78:K80:H9). *PLoS ONE* 4 (1): e.4232., 2009.

MOKADY, D., GOPHNA, U. & RON, E. Z. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *International Journal of Medical Microbiology*, 295: 455-462, 2005.

MOULIN-SCHOULER, M., SCHOULER, C., TAILLIEZ, P., KAO, M., BRÉE, A., GERMON, P., OSWALD, E., MAINIL, J., BLANCO & M., BLANCO, J. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (10): 3484-3492, 2006.

NAGAI, S., YAGIHASHI, T. & ISHIHAMA, A. An avian pathogenic *Escherichia coli*-strain produces a hemolysin, the expression of which is dependent on cyclic AMP receptor protein gene function. *Veterinary Microbiology*, 60: 227-238, 1998.

NCCLS, NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 8. ed. Pennsylvania:, 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf)>. Acesso em: 04 fev 2010.

NGELEKA, M., BRERETON, L., BROWN, G. & FAIRBROTHER, J. M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*, *pap*-, *pill*, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Diseases*, 46: 143-152, 2002.

NGELEKA, M., KWAGA, J. K. P., WHITE, D. G., WHITTAM, T. S., RIDDELL, C., GOODHOPE, R., POTTER, A. A. & ALLAN, B. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infection and Immunity*, 64(8): 3118-3126, 1996.

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

NORTON, R. A. Avian cellulitis, *World's Poultry Science Journal*, 53: 337-349, 1997.

NORTON, R. A., BILGILI, S. F. & MCMURTREY, B. L. A reproducible model for the induction of avian cellulitis in broiler chickens. *Avian Diseases*, 41: 422-428, 1997.

NORTON, R. A., MACKLIN, K. S. & MCMURTREY, B. L. Evaluation of scratches as an essential element in the development of avian cellulitis in broiler chickens. *Avian Diseases*, 43: 320-325, 1999.

OZAWA, M., HARADA, K., KOJIMA, A., ASAI, T. & SAMESHIMA, T. Antimicrobial susceptibilities, serogroups, and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *Avian Diseases*, 52: 392–397, 2008.

PARREIRA, V. R. & GYLES, C. L. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infection and Immunity*, 71 (9): 5087-5096, 2003.

PEIGHMBARI, S. M., VAILLANCOURT, J. P., WILSON, R. A. & GYLES, C. L. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from Avian cellulitis. *Avian Diseases*, 39: 116-124, 1995.

PHILIPPE, H. & DOUADY, C. J. Horizontal gene transfer and phylogenetics. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 498-505, 2003.

POURBAKHSH, S. A., BOULIANNE, M. B, MARTINEAU-DOIZE, M. & FAIRBROTHER, J. M. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Veterinary Microbiology*, 58: 195-213, 1997a.

POURBAKHSH, S. A., DHO-MOULIN, M., BRÉE, A., DESAUTELS, C., MARTINEAU-DOIZE, M. & FAIRBROTHER, J. M. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis* 22: 331-341, 1997b.

POUTTU, R., WESTERLUND-WIKSTRO, B., LÅNG, H., ALSTI, K., VIRKOLA, R., SAARELA, U., SIITONEN, A., KALKKINEN, N. & KORHONEN, T. K. *matB*, a common fimbriin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. *Journal of Bacteriology*, 183 (16): 4727–4736, 2001.

PROVENCE, D. L. & CURTISS, R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity*, 62 (4): 1369-1380, 1994.

RANDALL, C. J., MEAKINS, P. A., HARRIS, M. & WATT, D. J. A new skin disease in broilers? *The Veterinary Record*, 214: 246, 1984.

RODRIGUES-SIEK, K. E., GIDDINGS, C. W., DOETKOT, C., JOHNSON, T. J., FAKHR, M. K. & NOLAN, L. K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, 151: 2097-2110, 2005.

RUSSO, T. A. & JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extra-intestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181: 1753-1754, 2000.

RUSSO, T. A., CARLINO, U. B. & JOHNSON, J. R. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 69 (10): 6209–6216, 2001.

SABRI, M., CAZA, M., PROULX, J., LYMBEROPOULOS, M. H., BRÉE, A., MOULIN-SCHOULEUR, M., CURTISS III, R. & DOZOIS, C. M. Contribution of the *SitABCD*, *MntH*, and *FeoB* metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infection and Immunity*, 76: 601-611, 2008.

SABRI, M., LE VEILLE, S. & DOZOIS, C. M. A *SitABCD* homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology*, 152: 745-758, 2006.

SAUER, F. G., MULVEY, M. A., SCHILLING, J. D., MARTINEZ, J. J. & HULTGREN, S. J. Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 65-72, 2000.

SCHROEDER, C. M., MENG, J., ZHAO, S., DEBROY, C., TORCOLINI, J., ZHAO, C., MCDERMOTT, P. F., WAGNER, D. D., WALKER, R. D. & WHITE, D. G. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans *Emerging Infectious Diseases*, 8 (12), 1409-1414, 2002.

SCHUBERT, S., PICARD, B., GOURIOU, S., HEESEMANN, J. & DENAMUR, E. *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extra-intestinal infections. *Infection and Immunity*, 70: 5335-5337, 2002.

SINGER, R. S., ATWILL, E. R., CARPENTER, T. E., JEFFREY, J. S., JOHNSON, W. O. & HIRSH, D. C. Selection bias in epidemiological studies of infectious disease using *Escherichia coli* and avian cellulitis as an example. *Epidemiology and Infection*, 126: 139-145, 2001.

SINGER, R. S., JEFFREY, J. S., CARPENTER, T. E., COOKE, C. L., ATWILL, E. R., JOHNSON, W. O. & HIRSH, D. C. Persistence of cellulitis-associated *Escherichia coli* DNA fingerprint in successive broiler chicken flocks. *Veterinary Microbiology*, 75: 59-71, 2000.

SINGER, R. S., JEFFREY, J. S., CARPENTER, T. E., COOKE, C. L., CHIN, R. P., ATWILL, E. R. & HIRSH, D. C. Spatial heterogeneity of *Escherichia coli* DNA fingerprints isolated from cellulitis lesions in chickens. *Avian Diseases*, 43: 756-762, 1999.

SINGER, R. S. & HOFRACRE, C. L. Potential impacts of antibiotic use in poultry production. *Avian Diseases*, 50: 161-172, 2006.

SKYBERG, J. A., JOHNSON, T. J., JOHNSON, J. R., CLABOTS, C., LOGUE, C. M. & NOLAN, L. K. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infection and Immunity*, 74 (11): 6287-6292, 2006.

SMITH, S. G. J., MAHON, V., LAMBERT, M. A. & FAGAN, R. P. A molecular Swiss army knife: *OmpA* structure, function and expression. *FEMS Microbiological Letters*, 273: 1-11, 2007.

SORSA, L. J., DUFKE, S., HEESEMANN, J. & SCHUBERT, S. Characterization of an *iroBCDEN* gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evi-

dence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. *Infection and Immunity*, 71: 3285-3293, 2003.

SRINIVASAN, U., FOXMAN, B. & MARRS, C. F. Identification of a gene encoding heat-resistant agglutinin in *Escherichia coli* as a putative virulence factor in urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 285-289, 2003.

STATHOPOULOS, C., PROVENCE, D. L. & CURTISS, R. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin *Tsh*, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infection and Immunity*, 67 (2): 772-781, 1999.

STORDEUR P., MARLIER, D., BLANCO, J., OSWALD, E., BIET, F. DHO-MOULIN, M. & MAINIL, J. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. *Veterinary Microbiology*, 84: 231–241, 2002.

STORDEUR, P., BRÉE, A., MAINIL, J. & MOULIN-SCHOULEUR, M. Pathogenicity of pap-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicemic lesions. *Microbes and Infection*, 6: 637–645, 2004.

SUKUPOLVI, S. & O'CONNOR, D. TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment. *Microbiological Reviews*, 54 (4): 331-341, 1990.

TIVENDALE, K. A., ALLEN, J. L., GINNS, C. A., CRABB, B. S. & BROWNING, G. F. Association of *iss* and *iucD*, but not *tsh*, with plasmid mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 72 (11): 6554-6560, 2004.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R. & CASE, C. L. Microbiologia. 6. ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 2000.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O. F. & CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999.

UBA Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura 2004/2005. Disponível em: <[www.uba.org.br](http://www.uba.org.br)>. Acesso em: 19 fev 2010

UBA Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura 2006/2007. Disponível em: <[www.uba.org.br](http://www.uba.org.br)>. Acesso em: 04 fev 2010

UBA Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura 2008/2009. Disponível em: <[www.uba.org.br](http://www.uba.org.br)>. Acesso em: 04 fev 2010

VAN DEN BOGAARD, A. E. & STOBBERINGH, E. E. Time to ban all antibiotics as animal growth promoting agents? *The Lancet*, 348: 619, 1996.

VAN DEN BOGAARD, A. E. & STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14: 327-335, 2000.

VIDOTTO, M. C., MÜLLER, E. E., DE FREITAS, J. C., ALFIERI, A. A., GUIMARÃES, I. G. & SANTOS, D. S. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 34: 531-538, 1990.

VIDOTTO, M. C., NAVARRO, H. R. & GAZIRI, L. C. J. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 59: 79-87, 1997.

VOKES, S., REEVES, S. A., TORRES, A. G. & PAYNE, S. M. The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. *Molecular Microbiology*, 33 (1): 63-73, 1999.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, 51 (2): 221-271, 1987.

WOOLEY R. E., SPEARS, K. R., BROWN, J., NOLAN, L. K. & FLETCHER, O. J. Relationship of the complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 36: 679-684, 1992.

YAGUCHI, K., OGITANI, T., OSAWA, R., KAWANO, M., KOKUMAI, N., KANE-SHIGE, T., NORO, T., MASUBUCHI, K. & SHIMIZU, Y. A virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Japan. *Avian Diseases*, 51: 656-662, 2007.

YANG, H., CHEN, S., WHITE, D. G., ZHAO, S., MCDERMOTT, P., WALKER, R. & MENG, J. Characterization of multiple- antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (8): 3483-3489, 2004.

ZANATTA, G. F., KANASHIRO, A. M. I., CASTRO, A. G. M., CARDOSO, A. L. S. P., TESSARI, E. N. C. & PULICI, S. C. P. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. *Arquivos do Instituto de Biologia*, 71 (3): 283-286, 2004.

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

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



# CURRICULUM VITAE

BARBIERI, N. L.

**Nome** Nicolle Lima Barbieri  
**Endereço eletrônico** [nicbarbieri@gmail.com](mailto:nicbarbieri@gmail.com)  
**Nascimento** Porto Alegre/RS - Brasil 31 de março de 1985

## Formação Acadêmica/Titulação

- 2008** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: RESISTÊNCIA À ANTIBIÓTICOS, PREVALÊNCIA DOS FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA, TIPAGEM FILOGENÉTICA E PERFIL FILOGENÉTICO DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA AVIÁRIA (APEC)  
Orientador: Fabiana Horn  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2003 - 2007** Graduação em Farmácia.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Avaliação de suscetibilidade a antimicrobianos e a prevalência de fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* patogênica aviária  
Orientador: Fabiana Horn  
Bolsista do(a): Propesq - UFRGS

## Atuação profissional

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS**

### Vínculo institucional

- 2008 - Atual** Vínculo: aluno de mestrado , Enquadramento funcional: aluno de mestrado , Carga horária: 40 h
- 2004 - 2007** Vínculo: aluno da graduação , Enquadramento funcional: aluno iniciação científica , Carga horária: 20 h

### Atividades

- 2009 - 2011** Projetos de pesquisa, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica

Colibacilose aviária: Epidemiologia molecular e análise da resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* patogênicas aviárias e estudo do estabelecimento da infecção em aves

- 05/2004 - 05/2006** Extensão Universitária, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde  
Prevalência de enteroparasitas em crianças carentes em idade escolar de um loteamento no município de porto alegre, RS
- 04/2004 – Atual** Projetos de pesquisa, Instituto de Biociências  
Investigação da resistência de cepas patogênicas aviárias de *Escherichia coli* à fagocitose por macrófagos de galinha , avaliação de suscetibilidade a antimicrobianos e a prevalência de fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* patogênica aviária

## **Produção em C, T& A**

### **Produção bibliográfica**

#### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. BENCKE, A., ARTUSO, G., REIS, R., BARBIERI, Nicolle Lima, ROTT, M.  
Enteroparasitoses em Escolares Residentes na Periferia de Porto Alegre, RS, Brasil. Revista de Patologia Tropical. , v.35, p.31 - 36, 2006.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)**

1. BARBIERI, Nicolle Lima, MATTER, L., HORN, F.  
VERIFICAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CASPASE POR CEPAS PATOGÊNICAS AVIÁRIAS DE *Escherichia coli* EM MACRÓFAGOS AVIÁRIOS HD11 In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre.  
**XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS. , 2007.**
2. BARBIERI, Nicolle Lima, AZEREDO, F., MATTER, L., HORN, F.  
Verificação da Ativação da Caspase 3/7 por cepas Patogênicas Aviárias de *Escherichia coli* In: XVIII Salão de Iniciação Científica, 2006, Porto Alegre.  
**XVIII Salão de Iniciação Científica. , 2006.**
3. BARBIERI, Nicolle Lima, AZEREDO, F., HORN, F.  
Verificação da Ativação da Caspase 3/7 em Macrófagos Aviários HD11 por Cepas Patogênicas Aviárias de *Escherichia coli* In: XVII Salão de Iniciação científica, 2005, Porto Alegre.

**XVII Salão de iniciação Científica.** , 2005.

4. BARBIERI, Nicolle Lima, BASTIANI, M., AZEREDO, F., REIS, R., HORN, F.

Adesão de uma Cepa Patogênica Aviária de *Escherichia coli* a Células Epiteliais In: XVI Salão de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre.

**XVI Salão de Iniciação Científica.** , 2004.

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BARBIERI, Nicolle Lima, MATTER, L., BRITO, B. G., EWERS, C., HORN, F.

Antibiotic Resistance and Prevalence of Virulence Factors in Strains of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) In: 109th general meeting of American Society for microbiology, 2009, Filadélfia.

**109th general meeting of American Society for microbiology.** Washington, DC: American Society for microbiology, 2009.

2. BARBIERI, Nicolle Lima, MATTER, L., BRITO, B. G., HORN, F.

Resistência a antibióticos, Prevalência dos Fatores Associados a Virulência e Perfil Filogenético de Isolados de *Escherichia coli* Patogênica Aviária (APEC) In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Ipojuca.

**25º Congresso Brasileiro de Microbiologia.** , 2009.

3. BARBIERI, Nicolle Lima, MATTER, L., BRITO, B. G., HORN, F.

Antibiotics resistance and Virulence factors prevalence in strains of Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) In: XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2008, Águas de Lindóia.

**XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology.** , 2008.

4. MATTER, L., BARBIERI, Nicolle Lima, HORN, F.

Interaction between APEC and avian fibroblast cells (CEC32) In: XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2008, Águas de Lindóia.

**XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology.** , 2008.

5. MATTER, L., BARBIERI, Nicolle Lima, AZEREDO, F., HORN, F.

ADHESION TO AND INVASION OF AVIAN FIBROBLASTS BY AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* In: 10 IUMB conference e 36 reunião anual SBBQ, 2007, Salvador.

**10 IUMB conference e 36 reunião anual SBBQ.** , 2007.

6. BARBIERI, Nicolle Lima, MATTER, L., HORN, F.

AVIAN FIBROBLAST INFECTION WITH APEC DID NOT RESULT IN CASPASE 3/7 ACTIVATION In: 10 IUMB conference e 36 reunião anual SBBQ, 2007, Salvador.

**10 IUMB conference e 36 reunião anual SBBQ. , 2007.**

7. BARBIERI, Nicolle Lima, AZEREDO, F., HORN, F.

Strains of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) induce caspase 3 activation in HD11 cell line of chicken macrophages In: XXXV Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006, Águas de Lindóia.

**XXXV Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. , 2006.**

8. BARBIERI, Nicolle Lima, AZEREDO, F., BASTIANI, M., HORN, F.

Avian pathogenic *Escherichia coli* Strains Invade Chicken Embryo Fibroblasts In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Águas de Lindóia.

**XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. , 2005.**

9. BENCKE, A., ARTUSO, G., REIS, R., BARBIERI, Nicolle Lima, ROTT, M.

Investigação Parasitológica em Crianças Carentes de uma Escola de Porto Alegre, RS In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, Porto Alegre.

**XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia. , 2005.**

10. BENCKE, A., ARTUSO, G., REIS, R., BARBIERI, Nicolle Lima, ROTT, M.

Levantamento de Enteroparasitoses em Crianças Carentes de um Loteamento no Município de Porto Alegre, RS In: XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical do Cone Sul, 2005, Florianópolis.

**XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical do Cone Sul. , 2005.**

11. BENCKE, A., ARTUSO, G., REIS, R., BARBIERI, Nicolle Lima, ROTT, M.

Presença de Helmintos em Crianças da Periferia de Porto Alegre, RS In: 25ª sSemana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2005, Porto Alegre.

**25ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. , 2005.**

12. BENCKE, A., ARTUSO, G., REIS, R., BARBIERI, Nicolle Lima, ROTT, M.

Prevalência de Enteroparasitas em Crianças Carentes em Idade Escolar de um Loteamento no Município de Porto Alegre, RS In: 24ª Semana Científica do HCPA, 2004, Porto Alegre.

**24ª Semana Científica do HCPA. , 2004.**

## **Organização de evento**

1. CARLINI, C., MARGIS, R., Pelegriani, A., BARBIERI, Nicolle Lima, VARGAS FILHO, E. F., CHIELA, E. C., LOPES, F. C., MABONI, F., SALTON, G. D., VARGAS, J.E., SACHETT, L. G., LOPEZ, P. L. C., VOLTOLINI, R., WEBER, S. S., FEDER, V., VILLODRE, E. S.

**Curso de Férias: Microrganismos Mocinhos ou Bandidos, 2009. (Outro, Organização de evento)**

2. CARLINI, C., MARGIS, R., Pelegri, A., BARBIERI, Nicolle Lima, PINHATI, V., CRESTANI, J., MATUO, R., RECK, J., SANDRI, M., SOUSA, F., LOPEZ, P. L. C., VILLODRE, E. S.

**Curso de Férias: Microrganismos o Mundo que não Enxergamos**, 2009. (Outro, Organização de evento)

## ANEXO I

### Proveniência dos Isolados de Colisepsicemia e Celulite

RS	Órgão de isolamento	Origem (cidade)	Ave
RS001	INTESTINO	a	1
RS002	CORAÇÃO	a	2
RS003	CORAÇÃO	a	3
RS004	FÍGADO	b	4
RS05	FÍGADO	b	5
RS007	FÍGADO	c	6
RS008	CORAÇÃO	c	6
RS009	FÍGADO	c	7
RS010	CORAÇÃO	c	7
RS011	AERO	c	8
RS012	AERO	c	9
RS013	FÍGADO	b	10
RS017	CORAÇÃO	b	11
RS018	INTESTINO	b	12
RS020	CORAÇÃO	c	13
RS021	CARCAÇA	b	14
RS022	FÍGADO	b	15
RS023	INTESTINO	b	15
RS024	FÍGADO	d	16
RS025	INTESTINO	d	16
RS026	FÍGADO	e	17
RS027	INTESTINO	e	17
RS028	FÍGADO	f	18
RS029	INTESTINO	f	18
RS030	CORAÇÃO	f	18
RS031	FÍGADO	d	19
RS032	INTESTINO	d	19
RS033	CORAÇÃO	d	19
RS037	CARCAÇA	f	20
RS038	FÍGADO	d	21
RS039	INTESTINO	d	21
RS040	CORAÇÃO	d	21
RS042	FÍGADO	g	22
RS043	INTESTINO	g	22
RS044	CORAÇÃO	g	22
RS045	FÍGADO	h	23
RS046	INTESTINO	h	23

<b>RS</b>	<b>Órgão de isolamento</b>	<b>Origem (cidade)</b>	<b>Ave</b>
RS047	CORAÇÃO	h	23
RS048	CORAÇÃO	i	24
RS049	CARCAÇA	a	25
RS050	CARCAÇA	h	26

<b>PR</b>	<b>Órgão de isolamento</b>	<b>Origem (cidade)</b>	<b>Ave</b>
pr001	celulite	0675-28C	1
pr002	celulite	0675-29C	2
pr003	celulite	0675-30C	3
pr004	celulite	0675-37	4
pr006	celulite	0675-50C	5
pr007	celulite	0675-51C	6
pr008	celulite	0675-52C	7
pr009	celulite	0675-55C	8
pr010	celulite	0675-57C	9
pr011	celulite	0675-67	10
pr012	celulite	0675-87C	11
pr013	celulite	0675-89C1	12
pr014	celulite	0675-89C2	12
pr015	celulite	675-92C	13
pr016	celulite	0675-95C	14
pr017	celulite	0675-99C	15
pr018	celulite	0675-1087 SAC	16
pr019	celulite	1087-5GC	17
pr020	celulite	P36/5	18
pr021	celulite	33/06 BIG	19
pr022	celulite	35/06 BIG	20
pr023	celulite	36/06 BIG	21
pr024	celulite	P33/2	22
pr025	celulite	P33/5	23
pr026	celulite	P36/3	24
pr027	celulite	P35/2	25
pr028	celulite	P35/3	26
pr029	celulite	45,5/5	27
pr030	celulite	63C	28
pr031	celulite	49,1/5	29
pr032	celulite	49,2/5	30
pr033	celulite	49,4/5	31
pr034	celulite	49,5/5	32

<b>PR</b>	<b>Órgão de isolamento</b>	<b>Origem (cidade)</b>	<b>Ave</b>
pr035	celulite	50,1/5	33
pr036	celulite	73,1C	34
pr037	celulite	74,4C	35
pr038	celulite	77,3C	36
pr039	celulite	44C	37
pr040	celulite	77,1C	38
pr041	celulite	70C	39
pr042	celulite	71C	40
pr043	celulite	77,5C	41
pr044	celulite	93C	42
pr045	celulite	68	43
pr046	celulite	53C	44
pr047	celulite	25C	45
pr048	celulite	80C	46
pr049	celulite	2.68.2C	47
pr050	celulite	2.84.1	48
pr051	celulite	2.84.2	49
pr052	celulite	2,84,3	50
pr053	celulite	2,84,4	51
pr054	celulite	2,84,5	52
pr055	celulite	2,84,6	53
pr056	celulite	74,2-C1	54
pr057	celulite	74,2-C2	55
pr058	celulite	2,2,155,2	56
pr059	celulite	1,1,120,2	57
pr061	celulite	1,1,119,2	58
pr062	celulite	1,2,88,1	59
pr063	celulite	2,1,104,3	60
pr064	celulite	1,2,91,1	61
pr065	celulite	1,1,114,1	62
pr066	celulite	2,2,197,1	63
pr068	celulite	1,2,88,5	64
pr069	celulite	2,2,195,4	65
pr070	celulite	JAIR 2	66
pr071	celulite	2,2,171,3	67
pr072	celulite	2,2,139,2	68
pr073	celulite	2,2,198,5	69
pr074	celulite	1,2,106,5	70
pr075	celulite	2,2,194,5	71
pr076	celulite	2,1,127,3	72
pr077	celulite	2,2,177,2A	73



<b>PR</b>	<b>Órgão de isolamento</b>	<b>Origem (cidade)</b>	<b>Ave</b>
pr078	celulite	2,2,177,1B	74
pr079	celulite	2,2,179,4	75
pr080	celulite	2,1,114,1	76
pr081	celulite	2,1,131,1	77
pr082	celulite	2,2,177,3	78
pr083	celulite	2,2,195,3	79
pr084	celulite	2,1,143,4	80
pr085	celulite	2,1,102,2	81
pr086	celulite	2,2,195,2	82
pr087	celulite	2,1,128,1	83
pr088	celulite	1,1,93,5	84
pr089	celulite	2,2,155,3	85
pr090	celulite	2,2,188,2	86
pr091	celulite	2,2,185,2	87
pr092	celulite	2,2,161,2	88
pr093	celulite	2,1,103,2(A5)	89
pr094	celulite	2,2,156,2	90
pr095	celulite	2,2,189,2	91
pr096	celulite	2,2,199,3	92
pr097	celulite	2,1,139,1	93
pr098	celulite	2,1,143,1	94
pr099	celulite	2,2,195,5B	95
pr100	celulite	2,2,166,2	96
pr101	celulite	2,2,177,1A	74
pr102	celulite	2,1,115,1	97
pr103	celulite	2,1,128,3	98
pr104	celulite	1,1,120,1	99
pr105	celulite	2,1,128,2	100
pr106	celulite	2,1,122,2	101
pr107	celulite	2,2,176,2	102
pr108	celulite	2,2,177,2B	73
pr109	celulite	2,1,123,1	103
pr110	celulite	1,2,106,3	104
pr111	celulite	2,2,188,1	105
pr112	celulite	2,2,189,3	106
pr113	celulite	2,1,103,2	107
pr114	celulite	2,2,185,1	108
pr115	celulite	2,1,131,2	109
pr116	celulite	JAIR 1	110
pr117	celulite	2,1,131,3	111
pr118	celulite	2,2,185,3	112

<b>PR</b>	<b>Órgão de isolamento</b>	<b>Origem (cidade)</b>	<b>Ave</b>
pr119	celulite	2,1,135,4	113
pr120	celulite	1,1,97,3	114
pr121	celulite	2,1,135,3	115
pr122	celulite	2,2,161,1	116
pr123	celulite	2,2,195,5A	117
pr124	celulite	2,1,135,1	118
pr125	celulite	2,2,194,1	119
pr126	celulite	2,2,199,1B	120
pr127	celulite	2,2,174,1	121
pr128	celulite	2,2,171,1	122
pr129	celulite	2,2,191,2	123
pr130	celulite	2,2,155,1	124
pr131	celulite	2,2,174,3	125
pr132	celulite	2,1,131,4	126
pr133	celulite	2,2,189,1	127
pr134	celulite	JAIR 3	128
pr135	celulite	2,2,194,3	129
pr136	celulite	1,2,106,1	130
pr137	celulite	1,1,114,4	131
pr138	celulite	2,1,119,2	132
pr139	celulite	1,1,93,2	133
pr140	celulite	2,2,174,4	134
pr141	celulite	2,2,197,2	135
pr142	celulite	2,2,163,3	136
pr143	celulite	2,2,174,6	137
pr144	celulite	2,2,163,2	138
pr145	celulite	2,1,103,2	139
pr146	celulite	2,1,135,2	140
pr147	celulite	2,1,122,1	141

## ANEXO II

### Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos e Grupo ECOR nos isolados de Colisseplicemia

	Ampicilina	Bacitracina	Cefalotina	Ceftiofur	Ciprofloxacino	Cloranfenicol	Enrofloxacino	Gentamicina	Neomicina	Nitrofurantoina	Norfloxacina	Tetraciclina	Sulfa	Trimetopim	Sulfa +Trimetopim	Grupo ECOR
RS001	R	R	R	R	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	D
RS002	R	R	R	R	I	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	D
RS003	S	I	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	R	S	S	D
RS004	R	R	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	B2
RS005	R	R	R	R	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S	S	B2
RS007	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	A
RS008	R	R	R	R	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	B2
RS009	R	R	R	R	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	D
RS010	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	D
RS011	R	R	R	R	I	S	I	S	I	R	I	S	S	S	S	B1
RS012	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	A
RS013	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	D
RS017	r	r	r	r	s	r	r	s	r	s	i	r	r	s	s	D
RS018	s	r	s	s	s	s	s	s	i	s	s	r	r	s	s	B2
RS020	r	r	r	r	i	r	r	s	r	i	i	r	r	s	s	D
RS021	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	A
RS022	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	D
RS023	S	S	S	I	S	S	I	R	R	S	I	S	S	S	S	A
RS024	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	B2
RS025	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	A
RS026	R	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	A
RS027	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	B1

	Ampicilina	Bacitracina	Cefalotina	Ceftiofur	Ciprofloxacino	Cloranfenicol	Enrofloxacin	Gentamicina	Neomicina	Nitrofurantoina	Norfloxacina	Tetraciclina	Sulfa	Trimetropim	Sulfa +Trimetropim	Grupo ECOR
RS028	R	R	R	R	S	S	S	I	R	S	S	R	R	S	S	B2
RS029	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	B2
RS030	R	R	R	R	R	S	R	I	I	S	R	R	S	S	S	A
RS031	R	R	R	R	S	S	S	I	R	S	S	R	R	S	S	D
RS032	R	R	R	R	S	S	I	S	I	S	S	R	R	I	R	B2
RS033	R	R	R	R	I	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	A
RS037	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	D
RS038	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	A
RS039	R	R	R	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	A
RS040	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	A
RS042	R	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	B2
RS043	R	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	D
RS044	R	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	A
RS045	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	R	S	D
RS046	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	D
RS047	R	R	R	R	S	R	I	S	S	R	S	S	R	S	S	D
RS048	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	B2
RS049	R	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	A
RS050	R	R	R	R	I	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	A

R= resistente; I= intermediario; S= sensível.

Grupos ECOR: A, B1, B e D

### ANEXO III

#### Suscetibilidade aos agentes antimicrobianos e grupo ECOR nos isolados de Celulite

	Ampicilina	Bacitracina	Cefalotina	Ceftiofur	Ciprofloxacino	Cloranfenicol	Enrofloxacino	Gentamicina	Neomicina	Nitrofurantoina	Norfloxacina	Tetraciclina	Sulfa	Trimetropim	Sulfa + Trimetropim	Grupo ECOR
PR001	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	D
PR002	S	S	S	S	I	S	I	S	S	I	S	S	R	S	S	D
PR003	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	A
PR004	R	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	R	D
PR006	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A
PR007	R	R	S	I	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	B1
PR008	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	D
PR009	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	D
PR010	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A
PR011	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	R	S	S	D
PR012	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A
PR013	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	B2
PR014	R	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	B1
PR015	S	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	R	R	S	S	D
PR016	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	D
PR017	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	B2
PR018	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	A
PR019	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	I	R	R	S	S	B1
PR020	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	R	A
PR021	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I	R	A
PR022	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	D
PR023	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	D
PR024	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	S	D
PR025	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	S	D
PR026	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	B2
PR027	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	D
PR028	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	D
PR029	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B2

	Ampicilina	Bacitracina	Cefalotina	Ceftiofur	Ciprofloxacino	Cloranfenicol	Enrofloxacin	Gentamicina	Neomicina	Nitrofurantoina	Norfloxacina	Tetraciclina	Sulfa	Trimetopim	Sulfa + Trimetopim	Grupo ECOR
PR030	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	I	R	R	S	R	B1
PR031	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A
PR032	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	D
PR033	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	R	S	S	B1
PR034	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	I	R	B1
PR035	R	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	B2
PR036	S	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	D
PR037	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	D
PR038	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	D
PR039	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	R	D
PR040	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	B2
PR041	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	D
PR042	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	B2
PR043	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B2
PR044	R	I	I	S	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	D
PR045	R	I	I	S	S	R	S	S	I	S	S	R	R	S	R	D
PR046	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S	S	B2
PR047	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	D
PR048	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	B1
PR049	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	D
PR050	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	A
PR051	R	I	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	R	S	S	D
PR052	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	D
PR053	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	I	R	D
PR054	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	D
PR055	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	D
PR056	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	B2
PR057	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B2
PR058	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	R	R	S	R	D
PR059	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	D
PR061	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	A
PR062	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	D
PR063	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	I	R	D
PR064	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	D

	Ampicilina	Bacitracina	Cefalotina	Ceftiofur	Ciprofloxacino	Cloranfenicol	Enrofloxacin	Gentamicina	Neomicina	Nitrofurantoina	Norfloxacin	Tetraciclina	Sulfa	Trimetopim	Sulfa + Trimetopim	Grupo ECOR
PR065	R	R	R	S	S	I	I	S	I	R	S	R	S	S	S	A
PR066	R	R	S	S	I	R	R	S	S	S	I	R	S	S	S	A
PR068	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	D
PR069	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	A
PR070	R	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	R	B2
PR071	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	S	B2
PR072	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	B2
PR073	R	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	R	R	A
PR074	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	R	R	S	S	A
PR075	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	B2
PR076	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	S	S	S	D
PR077	S	I	S	S	I	S	R	R	S	S	I	R	R	S	S	A
PR078	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I	R	A
PR079	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	B1
PR080	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	D
PR081	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	R	S	R	A
PR082	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	I	R	A
PR083	R	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	R	I	R	D
PR084	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	D
PR085	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	I	R	D
PR086	R	I	I	S	R	R	R	S	S	S	I	R	S	S	S	A
PR087	R	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	D
PR088	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	A
PR089	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	A
PR090	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	B2
PR091	S	S	I	S	I	R	R	S	I	I	I	R	S	S	S	A
PR092	S	I	S	S	I	S	R	I	I	S	I	R	R	R	R	B2
PR093	R	I	S	S	I	S	R	S	S	S	I	R	R	R	R	D
PR094	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	D
PR095	S	I	S	S	I	S	I	R	I	I	S	R	R	I	R	D
PR096	R	I	I	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	D
PR097	R	R	R	R	S	S	S	R	I	S	S	R	R	S	S	D
PR098	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	S	B1
PR099	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	R	D

	Ampicilina	Bacitracina	Cefalotina	Ceftiofur	Ciprofloxacino	Cloranfenicol	Enrofloxacin	Gentamicina	Neomicina	Nitrofurantoina	Norfloxacina	Tetraciclina	Sulfa	Trimetoprim	Sulfa + Trimetoprim	Grupo ECOR
PR100	S	I	I	S	S	S	S	R	I	I	S	R	R	S	S	A
PR101	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	D
PR102	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	A
PR103	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S	S	R	R	I	R	A
PR104	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	B2
PR105	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	I	R	A
PR106	R	R	R	R	S	S	S	R	I	S	S	R	R	S	S	D
PR107	R	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	R	R	R	D
PR108	R	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	I	R	A
PR109	S	S	S	S	R	S	R	S	I	S	I	R	R	R	R	D
PR110	S	I	S	S	S	R	S	S	I	S	S	R	R	S	S	B2
PR111	R	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	B2
PR112	R	I	I	R	S	S	S	S	I	S	S	R	R	I	R	A
PR113	S	S	S	S	R	S	R	S	I	S	I	R	R	I	R	D
PR114	S	I	I	S	I	R	R	S	I	S	I	R	S	S	S	A
PR115	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	B2
PR116	R	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	D
PR117	R	I	R	I	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	A
PR118	S	S	S	S	R	R	R	S	I	S	S	R	R	S	S	A
PR119	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	D
PR120	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	B1
PR121	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	D
PR122	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S	D
PR123	R	S	R	S	S	S	S	I	I	S	S	R	R	S	R	B2
PR124	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	D
PR125	S	S	S	S	R	S	R	R	I	S	I	R	R	S	S	B2
PR126	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	I	R	D
PR127	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	I	R	D
PR128	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	I	
PR129	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	I	I	D
PR130	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	R	S	R	A
PR131	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	D
PR132	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	A
PR133	R	R	R	I	R	R	R	S	I	S	R	R	R	I	R	D



	Ampicilina	Bacitracina	Cefalotina	Ceftiofur	Ciprofloxacino	Cloranfenicol	Enrofloxacin	Gentamicina	Neomicina	Nitrofurantoina	Norfloxacina	Tetraciclina	Sulfa	Trimetoprim	Sulfa + Trimetoprim	Grupo ECOR
PR134	R	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	I	R	D
PR135	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	B2
PR136	S	S	I	S	S	I	S	S	I	S	S	R	R	S	S	A
PR137	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	D
PR138	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	B2
PR139	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S	S	R	R	S	S	A
PR140	S	S	I	S	S	S	S	I	I	S	S	R	R	S	S	A
PR141	S	S	I	S	S	S	S	S	I	I	S	R	R	I	S	A
PR142	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S	S	R	R	I	I	B1
PR143	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	R	R	I	R	D
PR144	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	I	R	
PR145	S	I	I	S	R	S	R	S	I	S	R	R	R	R	R	D
PR146	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	A
PR 147	R	R	I	S	S	S	S	I	I	S	S	R	R	S	S	D

R= resistente; I= intermediario; S= sensible.

Grupos ECOR: A, B1, B e D

## ANEXO IV

### Prevalência dos fatores associados a virulência nos isolados de Colisseplicemia

cepa	<i>sfa/foc</i>	<i>malX</i>	<i>afa/dra</i>	<i>neuC</i>	<i>iha</i>	<i>hrlA</i>	<i>fimC</i>	<i>pic</i>	<i>hlyA</i>	<i>kpsMTIIT</i>	<i>sit Ep</i>	<i>ompA</i>	<i>iroN</i>	<i>gimB</i>	<i>sit chr</i>	<i>tratT</i>	<i>ibeA</i>	<i>chuA</i>	<i>vat</i>	<i>tsh</i>	<i>iucD</i>	<i>cvi/cva</i>	<i>papC</i>	<i>irp2</i>	<i>iss</i>	<i>astA</i>	<i>mat</i>	<i>fyuA</i>	<i>tia</i>	<i>ireA</i>	<i>crfA</i>	<i>sat</i>	<i>cnf1/2</i>		
RS001	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0		
RS002	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0		
RS003	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0		
RS004	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0		
RS005	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0
RS007	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0		
RS008	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0		
RS009	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0		
RS010	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0		
RS011	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0		
RS012	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	
RS013	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	
RS017	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
RS018	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	
RS020	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	
RS021	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
RS022	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	
RS023	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
RS024	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
RS025	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	
RS026	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	

cepa	<i>stx/foc</i>	<i>malX</i>	<i>afa/dra</i>	<i>neuC</i>	<i>iha</i>	<i>hlyA</i>	<i>fimC</i>	<i>pic</i>	<i>hlyA</i>	<i>kpsMT/IT</i>	<i>sit Ep</i>	<i>ompA</i>	<i>iroN</i>	<i>gimB</i>	<i>sit chr</i>	<i>trafT</i>	<i>ibeA</i>	<i>chuA</i>	<i>vat</i>	<i>tsh</i>	<i>iucD</i>	<i>cvi/cva</i>	<i>papC</i>	<i>irp2</i>	<i>iss</i>	<i>astA</i>	<i>mat</i>	<i>fyuA</i>	<i>tia</i>	<i>ireA</i>	<i>criA</i>	<i>sat</i>	<i>cnf1/2</i>	
RS027	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	
RS028	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0
RS029	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
RS030	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	
RS031	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
RS032	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	
RS033	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
RS037	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
RS038	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
RS039	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	
RS040	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
RS042	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
RS043	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
RS044	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	
RS045	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	
RS046	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
RS047	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	
RS048	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	
RS049	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
RS050	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
RS050	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	

0= gene ausente; 1= gene presente

## ANEXO V

### Prevalência dos fatores associados a virulência nos isolados de Celulite

cepa	<i>sfa/foc</i>	<i>malX</i>	<i>afa/dra</i>	<i>neuC</i>	<i>iha</i>	<i>hrlA</i>	<i>fimC</i>	<i>pic</i>	<i>hlyA</i>	<i>kpsMT/IT</i>	<i>sit Ep</i>	<i>ompA</i>	<i>iroN</i>	<i>gimB</i>	<i>sit chr</i>	<i>tratT</i>	<i>ibeA</i>	<i>chuA</i>	<i>vat</i>	<i>tsh</i>	<i>iucD</i>	<i>cvl/cva</i>	<i>papC</i>	<i>irp2</i>	<i>iss</i>	<i>astA</i>	<i>mat</i>	<i>fyuA</i>	<i>tia</i>	<i>ireA</i>	<i>crfA</i>	<i>sat</i>	<i>cnf1/2</i>			
PR001	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0		
PR002	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	
PR003	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0		
PR004	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0			
PR006	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0		
PR007	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	
PR008	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	
PR009	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	
PR010	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
PR011	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
PR012	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	
PR013	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	
PR014	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
PR015	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	
PR016	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
PR017	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	
PR018	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
PR019	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
PR020	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
PR021	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	
PR022	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	
PR023	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	

	<i>cepa</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>malX</i>	<i>afa/dra</i>	<i>neuC</i>	<i>iha</i>	<i>hrlA</i>	<i>fimC</i>	<i>pic</i>	<i>hlyA</i>	<i>kpsMT/IT</i>	<i>sit Ep</i>	<i>ompA</i>	<i>iron</i>	<i>gimB</i>	<i>sit chr</i>	<i>trafT</i>	<i>ibeA</i>	<i>chuA</i>	<i>vat</i>	<i>tsh</i>	<i>iucD</i>	<i>cvi/cva</i>	<i>papC</i>	<i>irp2</i>	<i>iss</i>	<i>astA</i>	<i>mat</i>	<i>fyuA</i>	<i>tia</i>	<i>ireA</i>	<i>criA</i>	<i>sat</i>	<i>cnf1/2</i>		
PR024	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0			
PR025	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0		
PR026	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0		
PR027	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
PR028	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0		
PR029	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	
PR030	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	
PR031	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
PR032	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
PR033	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	
PR034	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	
PR035	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
PR036	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	
PR037	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PR038	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PR039	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	
PR040	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0		
PR041	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	
PR042	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
PR043	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	
PR044	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
PR045	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
PR046	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
PR047	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	
PR048	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0

cepa	sfa/foc	maX	afa/dra	neuC	iha	hrlA	fimC	pic	hlyA	kpsMT/IT	sit Ep	ompA	iroN	gimB	sit chr	trafT	ibeA	chuA	vat	tsh	iucD	cvi/cva	papC	irp2	iss	astA	mat	fyuA	tia	ireA	criA	sat	cnf1/2		
PR049	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	
PR050	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0		
PR051	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0		
PR052	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	
PR053	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	
PR054	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0		
PR055	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	
PR056	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	
PR057	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
PR058	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	
PR059	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
PR061	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PR062	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	
PR063	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
PR064	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	
PR065	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
PR066	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
PR068	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0		
PR069	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
PR070	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	
PR071	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PR072	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
PR073	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0		
PR074	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0		
PR075	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	

cepa	sfa/foc	malX	afa/dra	neuC	iha	hrlA	fimC	pic	hlyA	kpsMT/IT	sit Ep	ompA	iron	gimB	sit chr	trafT	ibeA	chuA	vat	tsh	iucD	cvi/cva	papC	irp2	iss	astA	mat	fyuA	tia	ireA	criA	sat	cnf1/2	
PR076	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
PR077	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
PR078	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
PR079	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
PR080	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
PR081	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
PR082	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
PR083	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
PR084	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	
PR085	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
PR086	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
PR087	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0
PR088	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	
PR089	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
PR090	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0
PR091	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
PR092	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
PR093	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	
PR094	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0
PR095	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
PR096	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
PR097	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
PR098	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
PR099	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
PR100	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0

cepa	sfa/foc	maX	afa/dra	neuC	iha	hrlA	fimC	pic	hlyA	kpsMT/IT	sit Ep	ompA	iroN	gimB	sit chr	trafT	ibeA	chuA	vat	tsh	iucD	cvi/cva	papC	irp2	iss	astA	mat	fyuA	tia	ireA	criA	sat	cnf1/2		
PR101	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0		
PR102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	
PR103	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0		
PR104	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0		
PR105	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	
PR106	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0		
PR107	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0		
PR108	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	
PR109	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	
PR110	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0		
PR111	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0		
PR112	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0		
PR113	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0		
PR114	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	
PR115	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	
PR116	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0		
PR117	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	
PR118	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
PR119	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
PR120	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0		
PR121	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0		
PR122	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0		
PR123	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0		
PR124	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0		
PR125	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0		



	<i>cepa</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>malX</i>	<i>afa/dra</i>	<i>neuC</i>	<i>iha</i>	<i>hrlA</i>	<i>fimC</i>	<i>pic</i>	<i>hlyA</i>	<i>kpsMT/IT</i>	<i>sit Ep</i>	<i>ompA</i>	<i>iroN</i>	<i>gimB</i>	<i>sit chr</i>	<i>trafT</i>	<i>ibeA</i>	<i>chuA</i>	<i>vat</i>	<i>tsh</i>	<i>iucD</i>	<i>cvi/cva</i>	<i>papC</i>	<i>irp2</i>	<i>iss</i>	<i>astA</i>	<i>mat</i>	<i>fyuA</i>	<i>tia</i>	<i>ireA</i>	<i>criA</i>	<i>sat</i>	<i>cnf1/2</i>	
PR126	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	
PR127	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
PR128	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
PR129	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
PR130	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
PR131	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	
PR132	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	
PR133	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0		
PR134	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	
PR135	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	-	0	1	0	0	1	0	0		
PR136	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
PR137	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	
PR138	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	
PR139	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
PR140	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
PR141	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	
PR142	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
PR143	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	
PR144	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
PR145	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
PR146	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	
PR147	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	

0= gene ausente; 1= gene presente