

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS DE
***Escherichia coli* PATOGÊNICA AVIÁRIA E SUA RELAÇÃO COM O ÍNDICE**
DE PATOGENICIDADE *in vivo*

Dissertação de Mestrado

Suelle Vencato Rodrigues

PORTO ALEGRE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS DE
***Escherichia coli* PATOGÊNICA AVIÁRIA E SUA RELAÇÃO COM O ÍNDICE**
DE PATOGENICIDADE *in vivo*

Autora: Suelle Vencato Rodrigues

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária Preventiva, na especialidade de Sanidade Avícola.

Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes

PORTO ALEGRE

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues, Suelle Vencato
AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS DE
Escherichia coli PATOGENICA AVIÁRIA E SUA RELAÇÃO
COM O ÍNDICE DE PATOGENICIDADE in vivo / Suelle
Vencato Rodrigues. -- 2017.
52 f.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza
Moraes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. APEC. 2. Biofilme. 3. índice de patogenicidade.
4. Escherichia coli. 5. morfotipos. I. Moraes, Prof.
Dr. Hamilton Luiz de Souza, orient. II. Título.

Suelle Vencato Rodrigues

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ISOLADOS DE *Escherichia coli*
PATOGENICA AVIÁRIA E SUA RELAÇÃO COM O ÍNDICE DE
PATOGENICIDADE *in vivo*

Aprovada em: 21 de Março de 2017

APROVADO POR:

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Orientador e Presidente da Comissão

Prof^ª. Dr^ª. Luciana Ruschel dos Santos
Membro da Comissão

Prof^ª. Dr^ª. Karen Apellanis Borges
Membro da Comissão

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação aos meus pais
Marcia e Simão, aos meus irmãos Simone e
Mateus e aos meus familiares por todo
apoio, incentivo e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde, capacidade, paciência, iluminação e por ter posto pessoas maravilhosas no meu caminho, que de alguma forma colaboraram para que eu chegasse até esse momento.

Agradeço imensamente aos meus pais Marcia e Simão e aos meus irmãos Simone e Mateus por sempre estarem presentes apoiando e incentivando mesmo nos momentos mais difíceis. Se eu tenho a capacidade de persistir e busco sempre melhorar e prosperar é por ter vocês na minha vida.

Aos meus familiares sempre muito preocupados com o andamento dos meus estudos.

Ao grupo maravilhoso de pós-graduandos do CDPA por todas as risadas, histórias, alegrias e frustrações compartilhadas, vocês com certeza tornaram o mestrado mais divertido para mim.

Aos funcionários, professores e estagiários do CDPA, principalmente a Karen e ao Thales, pois em todas as vezes em que eu tive alguma dúvida eles sempre estavam dispostos a ajudar.

A Vanessa Laviniki por todo o auxílio oferecido e por todos os finais de semana gastos me ajudando, muito obrigada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes pela oportunidade de fazer o mestrado e pela orientação.

RESUMO

Escherichia coli patogênica aviária (APEC) é um dos patógenos que mais preocupa a indústria avícola mundial, pois gera prejuízos econômicos devido à mortalidade das aves e às perdas produtivas. Além disso, é uma bactéria com potencial zoonótico que possui genes de virulência semelhante aos genes das *E. coli* patogênicas extra-intestinais humanas. A persistência e a sobrevivência da APEC, tanto no ambiente quanto no hospedeiro, podem ser consequência da sua habilidade de formar biofilme. O presente trabalho tem por objetivo avaliar se a patogenicidade de cepas de APEC apresenta relação com a sua capacidade de formação de biofilme. Para este propósito foram utilizados 241 isolados de APEC de três diferentes origens (cama de aviário, lesões de celulite e doenças respiratórias), previamente classificados pelo índice de patogenicidade (IP) *in vivo* de 0 a 10. A formação de biofilme foi avaliada através da quantificação e qualificação da produção de biofilme em placas de poliestireno de 96 poços a 25°C por 24h e da avaliação morfológica das colônias em ágar contendo Vermelho Congo a 25°C e a 37°C para detectar a expressão fenotípica de fimbria curli e celulose. Com relação a produção de biofilme foram observadas 136 (56,4%) cepas produtoras e 105 (43,6%) não produtoras. Entre as cepas formadoras de biofilme, 111 (81,6%) foram classificadas como fracamente formadoras, 21 (15,4%) moderadamente formadoras e quatro (2,9%) como fortemente formadoras. No teste morfológico 88,4% dos isolados expressou um ou ambos os componentes da matriz extracelular, em pelo menos uma das temperaturas, e 11,6% dos isolados não foram capazes de expressar curli ou celulose. Neste estudo, 209 e 205 isolados pelo menos um dos componentes a 25°C e a 37°C respectivamente. Observou-se uma produção de celulose significativamente ($p < 0,01$) maior a 25°C. Por outro lado, a produção de curli foi significativamente ($p < 0,01$) maior a 37°C. Os dados do estudo indicam que não há associação ($p < 0,05$) entre a produção de biofilme e o IP *in vivo*, ou seja, a produção de biofilme não pode ser correlacionada ao IP *in vivo* dos isolados em questão conforme as condições deste estudo.

Palavras-chave: APEC, biofilme, celulose, *Escherichia coli*, fimbria curli, índice de patogenicidade.

ABSTRACT

Avian pathogenic Escherichia coli (APEC) is one of the pathogens that most concern the poultry industry worldwide, because it causes economic losses due to poultry mortality and productive reduction. Furthermore, it is a bacterium with zoonotic potential, which shares similar virulence genes with human extra-intestinal pathogenic E. coli (ExPEC). APEC persistence and survival, in the environment and in the host, may be a consequence of its ability to produce biofilm. The aim of this work was to evaluate if the pathogenicity of APEC strains are related to their biofilm production ability. For this purpose 241 APEC isolates from three different origins (broiler bedding material, cellulite lesions and respiratory disease) were selected. Their in vivo pathogenicity index was previously classified from 0 to 10. The biofilm formation was evaluated in by the quantification and qualification of biofilm production in 96-well polystyrene plates, and by the evaluation of colony morphology in Congo Red agar to detect the phenotypic expression of fimbriae curli and cellulose. Regarding biofilm production, it was observed 136 (56.4%) producers strains, and 105 (43.6%) non-producers strains. Concerning the biofilm forming strains 111 (81.6%) were classified as weakly producers, 21 (15.4%) as moderately producers, and four (2.9%) as strongly producers. In the morphologic test 88.4% of the isolates expressed one or both components in at least one of the temperatures and 11.6% of the isolates were not able to express curli or cellulose. In this study, 209 and 205 strains were able to produce at least one of the matrix components at 25°C and 37°C, respectively. Cellulose production was significantly ($p < 0.01$) higher at 25°C. On the other hand, the curli production was significantly ($p < 0.01$) higher at 37°C. The study data indicate that there is no association between biofilm production and in vivo IP, meaning that the biofilm production could not be correlated to the in vivo IP of the isolates in question according to this study conditions.

Keywords: APEC, biofilm, cellulose, Escherichia coli, fimbriae curli, pathogenicity index.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1	– Produção de biofilme dos 241 isolados de <i>Escherichia coli</i> de acordo com a origem de isolamento.....	32
Gráfico 2	– Distribuição dos isolados não produtoras, fracamente, moderadamente e fortemente produtora de biofilme em relação ao índice de patogenicidade.....	33
Fotografia 1	– Morfotipos de <i>E. coli</i> em ágar Vermelho congo a 25°C e a 37°C.....	34
Fotografia 2	– Fenótipos de <i>E. coli</i> em ágar Calcoflúor a 25°C e a 37°C.....	34
Gráfico 3	– Distribuição dos isolados por classificação morfológica a 25°C.....	35
Gráfico 4	– Distribuição dos isolados por classificação morfológica a 37°C.....	35
Gráfico 5	– Distribuição dos isolados conforme o componente expressado e a produção de biofilme a 25°C e a 37°C.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos isolados conforme as origens de isolamento.	28
---	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
APEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Aviária
BHI	Caldo Infusão Cérebro Coração
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTA	Doença Transmitida por Alimento
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EMB	Eosine-Methylene Blue
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
EPS	Substância Polimérica Extracelular
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Extra intestinal
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de Oxigênio
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
IP	Índice de Patogenicidade
IPI	Índice de Patogenicidade Individual
LT	Toxina Termolábil
mg/L	Miligramas por Litro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
NMEC	<i>Escherichia coli</i> associada a Meningite no Recém-Nascido
OD _a	Densidade óptica do isolado
OD _{cn}	Densidade óptica do controle negativo
p	Probabilidade de significância
PASW	Programa Statistics Base
pH	Potencial hidrogeniônico
ST	Toxina Termoestável
STATA	Data Analysis and Statistical Software

STEC	<i>Escherichia coli</i> shigatoxigênica
TSA	Agar Triptona de Soja
TSB	Caldo Triptona de Soja sem Dextrose
UFC	Unidade formadora de colônias
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatogênica
UV	Luz Ultravioleta
VC	Ágar contendo Vermelho Congo
VTEC	<i>Escherichia coli</i> verotoxigênica
VT	Verotoxina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
μL	Microlitros
®	Marca Registrada
>	Maior
<	Menor
≤	Menor ou igual
Σ	Soma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	<i>Escherichia coli</i>	14
2.2	Patotipos de <i>Escherichia coli</i>	15
2.3	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária (APEC).....	17
2.4	Índice de patogenicidade (IP)	19
2.5	Biofilme	20
2.6	Biofilme e saúde pública	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Microrganismos.....	28
3.2	Quantificação da produção de biofilme	28
3.3	Avaliação da expressão fenotípica de celulose e fímbria curli dos isolados de <i>Escherichia coli</i> em vermelho congo.....	29
3.4	Teste de produção de celulose dos isolados da <i>Escherichia coli</i> em calcoflúor	30
3.5	Análises estatísticas	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Quantificação da Produção de Biofilme.....	32
4.2	Avaliação da expressão fenotípica de celulose e fímbria curli dos isolados de <i>Escherichia coli</i> em vermelho congo.....	33
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42
	ANEXO A	48

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de carne de frango e o primeiro maior exportador, sendo este o quarto item da pauta de exportação do Brasil. Este desempenho pode ser explicado pela grande produção de grãos, emprego de tecnologia, disponibilidade de mão de obra, extensão territorial, clima favorável e grande preocupação com sanidade animal, refletindo em altos índices produtivos e preços competitivos aos de outros mercados. No ano de 2015, o Brasil produziu 13,14 milhões toneladas de carne de frango, destas, 4,3 milhões de toneladas foram exportadas. Segundo o último relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), o Rio Grande do Sul é o terceiro maior produtor de carne de frango, sendo responsável por 14,13% dos abates em 2015 (ABPA, 2016).

Para o desenvolvimento da avicultura mundial muitos desafios foram e são enfrentados e um deles é garantir a sanidade das aves e a higiene dos estabelecimentos de produção e de beneficiamento da carne. *Escherichia coli* é um dos patógenos que mais preocupa a indústria avícola, pois além de gerar prejuízos devido à mortalidade das aves no campo e à condenação total ou parcial das carcaças de aves (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2003; EWERS *et al.*, 2004) é uma bactéria com potencial zoonótico (EWERS *et al.*, 2009; BAUCHART *et al.*, 2010). A colibacilose é uma doença de manifestação extra-intestinal que pode ser primária, mas é principalmente secundária a outros agentes. Pode causar diversas patologias como: coliseptemia, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, aerossaculite, pericardite, celulite, coligranuloma, doença respiratória crônica complicada, onfalite, salpingite, síndrome da cabeça inchada, panoftalmia, osteomielite, ooforite e sinovite (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

E. coli é um habitante comum da flora gastrointestinal de humanos e de animais (BHUNIA, 2008). Nas aves é encontrada na concentração de 10^6 UFC/g de fezes, e o pó dos aviários pode conter 10^5 – 10^6 UFC/g. Acredita-se que, na presença de fatores estressores, a inalação do pó contaminado por *E. coli* leve a infecções sistêmicas (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2003; DZIVA; STEVENS, 2008; FERREIRA; KNÖBL, 2009).

E. coli patogênica aviária (APEC) é difícil de erradicar, provavelmente devido à habilidade de formar biofilme, o que dificultaria a sua eliminação do ambiente através da limpeza e desinfecção (OOSTERIK *et al.*, 2014). A maioria das bactérias em ecossistemas naturais e em infecções crônicas crescem em formato de biofilme e adotam

um fenótipo que é significativamente diferente de suas contrapartes planctônicas (COSTERTON, 2007). As principais substâncias que compõem a matriz extracelular da *E. coli* são a fimbria curli e a celulose (ZOGAJ *et al.*, 2001). Juntas essas substâncias poliméricas proporcionam ao biofilme agregação intercelular, formação da estrutura tridimensional resistência a dissecação, elasticidade (GUALDI *et al.*, 2008; HOBLEY *et al.*, 2015).

A formação de biofilme em ambientes de processamento de alimentos possui especial importância, uma vez que esta estrutura possui o potencial de atuar como uma fonte de contaminação microbiana crônica que pode conduzir à deterioração dos alimentos e a doenças transmitidas por alimentos. As bactérias em biofilmes geralmente exibem maior resistência à limpeza e ao saneamento (RODRIGUES *et al.* 2010; STEPANOVIĆ *et al.*, 2004). Biofilmes também são um desafio para a produção animal, uma vez que podem formar-se em temperatura ambiente e em superfícies plásticas e de metal presentes nos sistemas de água de instalações avícolas e industriais (SKYBERG *et al.*, 2007).

Apesar de muitos trabalhos citarem a relação da formação de biofilme de cepas de *E. coli* potencialmente patogênicas, estes somente fazem a pesquisa de genes de virulência. Pouco é discutido em relação à patogenicidade isolados. O presente trabalho tem como objetivos avaliar a formação de biofilme de cepas de APEC e a sua relação com o índice de patogenicidade *in vivo*, além de verificar a relação da produção de biofilme das cepas de APEC com a sua origem (cama de aviário, lesões de celulite e doenças respiratórias) e em relação expressão fenotípica de curli e celulose através de teste morfológico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

Em 1885 Theodor von Escherich foi o primeiro a descrever *Escherichia coli*, denominando-a *Bacterium coli commune*. A denominação atual foi dada por Castellani e Chalmers em 1919 (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2003). Inicialmente foi considerado um microrganismo não patogênico e componente da microbiota entérica da maioria dos animais. Com o decorrer do tempo alguns sorogrupos de *E. coli* começaram a ser associados a diversas patologias tanto em homens quanto em animais (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

E. coli pertence à família *Enterobacteriaceae*, da qual fazem parte bactérias que são capazes de crescer em ambientes aeróbios e anaeróbios usando fontes de carbono simples e nitrogênio (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2003). É uma bactéria Gram negativa, em forma de bastonete não esporulado, podendo ser móvel ou imóvel, com tamanho variando entre 1,1 a 1,5 μ m por 2 a 6 μ m (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

De fácil cultivo laboratorial, a *E. coli* cresce em meio de cultivo comum em temperaturas de 18°C a 44°C, sendo a temperatura ideal 37°C. Geralmente as colônias possuem de 1 a 3mm de diâmetro, podendo ser lisas ou rugosas (FERREIRA; KNÖBL, 2009). Por serem fermentadores de lactose, no ágar Mac Conkey as colônias apresentam a cor rosa clara circundadas por um precipitado. Em ágar EMB (Eosina-Azul de Metileno) são verde escuras com brilho metálico. Em ágar sangue cepas hemolíticas formam um halo de beta hemólise (QUINN *et al.*, 2005).

Nos testes bioquímicos *E. coli* apresenta produção de ácido e gás após a fermentação da glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramanose, sorbitol e arabinose. A descarboxilação de ornitina, arginina e a fermentação do adonitol, sacarose, salicina, rafinose, ducitol são variáveis (FERREIRA; KNÖBL, 2009). A maioria das cepas fermenta lactose, porém algumas amostras podem não ter essa capacidade. Os testes de oxidase, utilização do citrato, hidrólise de ureia, liquefação de gelatina, a reação de Voges-Proskauer e a produção de H₂S são negativos (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2003). É uma bactéria produtora de indol, positiva para reação de vermelho de metila, redutora de nitrato em nitrito e descarboxiladora da lisina (ANDREATTI FILHO, 2006). As provas bioquímicas para *E. coli* são úteis para

diferenciá-la de outras *Escherichia* e de outras enterobactérias (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2003).

A classificação de *E. coli* em sorogrupos é baseada na identificação das estruturas antigênicas que ela apresenta, como antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H), e fimbriais (F) (QUINN *et al.*, 2005). Foram descritos até o momento 177 antígenos O, 100 antígenos K e 52 antígenos H. O antígeno somático corresponde à fração da camada de lipopolissacarídeo termorresistente presente na parede celular das bactérias Gram negativas que se projeta para o espaço extracelular. Esta Fração é composta por polissacarídeos (FERREIRA; KNÖBL, 2009). Os antígenos capsulares estão presentes na superfície da célula bacteriana, são compostos por ácido polimérico contendo 2% de açúcares reduzidos e estão associados com a virulência e a resistência ao sistema complemento (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2003). O antígeno flagelar é de natureza proteica e não é muito utilizado na identificação antigênica das amostras de *E. coli*. A presença do flagelo não tem sido relacionada com a patogenicidade (FERREIRA; KNÖBL, 2009). O antígeno fimbrial também possui natureza proteica, recobre a superfície da célula e é denominado pelos termos de adesinas, pili ou fimbrias. É considerado um fator de virulência por estar envolvido no processo de adesão celular e invasão dos tecidos do hospedeiro. (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2003).

A investigação do sorotipo não é o melhor método para distinção entre os isolados de APEC e os isolados de outras *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC). Contudo ainda é um método comum para estimar o potencial patogênico das cepas de APEC. Sabe-se que os sorogrupos O1, O2, O8, O18 e O78 são os mais frequentemente detectados nos isolados de aves doentes (DZIVA; STEVENS, 2008; EWERS *et al.*, 2009).

2.2 Patotipos de *Escherichia coli*

E. coli também pode ser classificada baseando-se nos mecanismos de virulência apresentados pelo isolado e nos sintomas clínicos nos seguintes patotipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC).

EPEC causa a gastroenterite infantil e diarreia em humanos e animais (FERREIRA; KNÖBL, 2009; LAWLEY; CURTIS; DAVIS, 2012). EPEC liga-se

intimamente ao enterócito causando lesões severas denominadas *attaching/effacing* devido à presença do gene *eae* (QUINN *et al.*, 2005; FERREIRA; KNÖBL, 2009). As vilosidades desaparecem gradualmente e há perda da capacidade de absorção dos nutrientes (BHUNIA, 2008).

EPEC é conhecida por causar a diarreia dos viajantes, pois pode estar presente na água e na comida de países de clima tropical (LAWLEY; CURTIS; DAVIS, 2012). EPEC adere-se às células da mucosa intestinal e produz a toxina termolábil (LT) ou a toxina termoestável (ST), mas não invade o enterócito (BHUNIA, 2008; QUINN *et al.*, 2005). A LT possui dois tipos de toxinas LT1 e LT2, que são similares as toxinas de *Vibrio cholerae*. A ST também possui dois tipos de toxinas STa, que é solúvel em metanol e causa secreção de fluídos e perdas iônicas, e STb, que não é solúvel em metanol e gera a liberação de eletrólitos e água das células intestinais (BHUNIA, 2008).

EHEC é causadora da diarreia hemolítica, da síndrome urêmica e da doença do edema em suínos. Também é conhecida também como *E. coli* toxina *Shiga-like* (STEC), pois produz uma toxina similar à da *Shigella dysenteriae* ou por *E. coli* verotoxigênica (VTEC) uma vez que as toxinas geradas pela EHEC destroem as células Vero (cultura de tecido derivada do rim do macaco Verde Africano). O sorotipo mais conhecido deste patotipo é O157:H7 causadora de doenças transmitidas por alimentos como carne moída (salame e hambúrguer) e leite cru (QUINN *et al.*, 2005; BHUNIA, 2008; LAWLEY; CURTIS; DAVIS, 2012). A verotoxina (VT) causa efeito deletério as células endoteliais após ser absorvida. As lesões podem levar à ocorrência de edema, hemorragia e trombose. A doença do edema em suíno é causada pela VT2 (QUINN *et al.*, 2005).

EPEC é associado à diarreia aquosa em crianças e em adultos imunocomprometidos, e é a segunda maior causadora da doença dos viajantes devido a água e alimentos contaminados (LAWLEY; CURTIS; DAVIS, 2012). Produz a citotoxina EAST (toxina estável enteroagregativa) (FERREIRA; KNÖBL, 2009). A EPEC adere-se aos enterócitos formando um padrão de aderência em forma de agregados caracterizado como “tijolo empilhado”. EPEC aumenta a secreção de muco das células caliciformes e aprisiona-se em um biofilme mucoso (BHUNIA, 2008).

EPEC gera diarreia aquosa e disenteria. EPEC liga-se às células epiteliais e multiplica-se no citoplasma, depois projeta-se para as células adjacentes. A diarreia aquosa está ligada a toxina codificada pelo gene plasmidial *sen* (BHUNIA, 2008).

ExPEC engloba patotipos de *E. coli* causadores de doenças extra-intestinais, como *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* de meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* patogênica aviária (APEC) (FERREIRA; KNÖBL, 2009; RUSSO; JOHNSON, 2000).

2.3 *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC)

APEC é um importante patógeno para a indústria, pois resultam em perdas econômicas severas, devido a mortalidade, retardo no crescimento, condenação de carcaça, queda na produção de ovos, decréscimo da eclodibilidade e os custos associados com tratamento e profilaxia (EWERS *et al.*, 2009; KNÖBL *et al.*, 2012; GUABIRABA; SCHOULER, 2015). A infecção geralmente se manifesta por uma septicemia inicial seguida de morte súbita ou de inflamação localizada em diversos órgãos, dependendo da virulência da cepa, do estado imune da ave e da presença de fatores predisponentes (DZIVA; STEVENS, 2008).

E. coli é uma habitante normal do trato gastrointestinal das aves e não causa prejuízo ao animal se o crescimento e a colonização for controlado por outras populações da microbiota comensal do intestino (PASQUALI *et al.*, 2015). É considerado um patógeno oportunista, ocasionando mais doenças secundárias do que primárias (SKYBERG *et al.*, 2007). Quando fatores estressores levam ao desequilíbrio da microbiota, a APEC pode multiplicar-se demasiadamente, migrar para outros tecidos e causar infecções extraintestinais (DZIVA; STEVENS, 2008; PASQUALI *et al.*, 2015). Essa habilidade de translocar-se tanto da mucosa intestinal quanto da respiratória e disseminar-se por vários órgãos faz com que a APEC pertença também ao grupos de ExPEC, que incluem NMEC e UPEC (DZIVA; STEVENS, 2008).

As concentrações de *E. coli* nas fezes e na poeira dos aviários é aproximadamente 10^6 UFC, dos quais 10 a 15% são cepas potencialmente pertencentes ao patotipo APEC (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2003). O intestino das aves é um importante reservatório natural de APEC, da mesma maneira que a UPEC tem como principal fonte o trato intestinal humano (DZIVA; STEVENS, 2008). Conseqüentemente cepas de APEC estão presentes nos ambientes de criação de aves, sendo as fezes a principal fonte de transmissão (GUABIRABA; SCHOULER, 2015).

Os fatores estressores que levam ao desbalanço da microbiota podem ser alta quantidade de amônia, umidade da cama, poeira, variação climática, alta densidade, vacinações, mudanças de ração, além da presença de outros agentes patogênicos, como *Mycoplasma*, vírus da bronquite infecciosa, vírus da doença de Newcastle incluindo cepas vacinais, entre outros (ANDREATTI FILHO, 2006; DZIVA; STEVENS, 2008; KEMMETT *et al.*, 2013).

APEC causa infecções em todos os tipos de aves e em qualquer idades, sendo mais grave nas mais jovens (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2003). Dependendo da virulência da cepa, das condições do hospedeiro, da presença e do tipo de fatores predisponentes a infecção pode manifestar-se inicialmente como septicemia seguida por morte súbita ou inflamações localizadas em múltiplos órgãos (DZIVA; STEVENS, 2008).

A principal rota para o início da colibacilose sistêmica é o trato respiratório. A colonização inicia na traqueia e nos sacos aéreos, seguidos pela infecção do fígado, pericárdio, bacteremia e infecção em outros órgãos. Pode ocorrer em aves estressadas ou imunocomprometidas (GUABIRABA; SCHOUER, 2015). As lesões do trato respiratório incluem: traquite, aerossaculite, pneumonia e pleuropneumonia (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

As patologias comumente associadas à colibacilose são periepatite, aerossaculite, pericardite, peritonite da gema do ovo, salpingite, coligranuloma, onfalite, celulite, osteomielite, artrite, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, panoftalmia, ooforite, sinovite, doença respiratória crônica complicada e síndrome da cabeça inchada (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2003; FERREIRA; KNÖBL, 2009). Outra lesão importante na avicultura comercial é a celulite, a qual acarreta em condenações parciais de carcaças, quando é localizada, ou totais, quando a lesão é extensa. A celulite consiste em uma infecção de aspecto caseoso que ocorre no subcutâneo quando a pele da ave é ferida e há o acúmulo de exsudato heterofílico (FERREIRA; KNÖBL, 2009). Embora outros agentes possam estar associados à celulite, o principal é *E. coli* (JOHNSON *et al.*, 2001). Os fatores que influenciam a frequência de casos podem ser densidade do lote, reutilização sucessiva da cama, intervalo entre lotes, genética e sexo das aves (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2003).

A APEC e a ExPEC humana encontram desafios semelhantes para estabelecer infecções em seus hospedeiros, ambas comportam-se de maneira similar nas temperaturas corporais de humanos e aves e possuem genes de virulência em comum, o que sustenta a

ideia de que certas cepas de ExPEC de humanos e aves possam ter potencial zoonótico (RODRIGUEZ-SIEK *et al.*, 2005; EWERS *et al.*, 2007; BAUCHART *et al.*, 2010). Contudo, a similaridade entre os patotipos não é suficiente para confirmação do potencial zoonótico, pois não existem estudos que descrevam a rota de transmissão, a frequência com a qual cepas de animais contaminam humanos causando doenças (SINGER, 2015).

2.4 Índice de patogenicidade (IP)

O nível de patogenicidade do isolado é um aspecto essencial para tomada de decisão frente a um desafio encontrado no campo. Alguns pesquisadores tem procurado métodos de associação para prever a patogenicidade das cepas através da pesquisa de genes de virulência (JOHNSON *et al.*, 2008; NAKAZATO *et al.*, 2009; KEMMETT *et al.*, 2013). No entanto há diversos fatores além da presença do gene que podem influenciar a patogenicidade, como as interações entre bactéria, sistema imunológico do hospedeiro e ambiente (NAKAZATO *et al.*, 2009). Por esta razão, o índice de patogenicidade *in vivo* continua sendo a maneira mais precisa para demonstrar a patogenicidade da amostra. Souza *et al.* (2016) desenvolveram um método mais preciso para inferir o índice de patogenicidade (IP), o qual além de avaliar a letalidade considera também, o tempo de morte, através do fator bônus por sobrevivência, e a capacidade de causar lesões de colibacilose, avaliando a presença de cinco tipos de lesões: pericardite, perihepatite, peritonite, aerossaculite e celulite.

Para obter-se IP primeiro foi determinado o índice de patogenicidade individual (IPI), no qual para cada isolado foram inoculados experimentalmente 10 pintinhos SPF de um dia de idade. Durante sete dias após a inoculação foram observados a taxa de letalidade e o tempo de morte destes pintinhos, que foram necropsiados para verificação de lesões características de colibacilose (perihepatite, pericardite, peritonite, aerossaculite e celulite). Quando a lesão estava presente atribuiu-se o valor “1” e na ausência da lesão o valor “0”. Também foi utilizado o tempo de morte para calcular o IPI animais que morreram nas primeiras 24h e com isolamento positivo de *E. coli* recebiam pontuação 1 para todos os itens observados, totalizando score 10 (índice máximo). Do segundo ao sétimo dia houve uma diminuição proporcional da pontuação, esta correção foi calculada dividindo o valor 1 por 7, correspondendo a 0,1428, o qual é subtraído do valor 1 a cada dia que o animal sobrevive. Esta constante (0,1428) foi denominada fator de bonificação. Os valores obtidos são aplicados na seguinte fórmula: $IPI = (tm \times 5) + Pc + Ph + Pt + A$

+ C, na qual “T_m” é tempo de morte, “P_c” é pericardit, “P_h” é perihepatite, “P_t” é peritonite, “A” é aerossaculite e “C” celulite. Para o cálculo do IP de cada isolado é feita a média da pontuação obtida pelos 10 pintinhos do grupo: $IP = \sum (IPI)/N$, na qual “N” é o número de pintinhos inoculados (SOUZA *et al.*, 2016).

2.5 Biofilme

O princípio da descoberta do biofilme é atribuído ao cientista holandês Antonie van Leeuwenhoek, que no século XVII, utilizando seus microscópios simples observou pela primeira vez microrganismos de sua própria placa dentária (DONLAN, 2002; BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008). Em 1943, o microbiologista Claude ZoBell descreveu o então chamado *bottle effect*, fenômeno no qual o número de microrganismos planctônicos na água do mar fresca diminui gradualmente quando a água é mantida em uma garrafa de vidro, enquanto que o número de microrganismos sésseis aumenta (COENYE; NELIS, 2010). Porém, somente em 1978, Costerton e colaboradores apresentaram uma teoria de biofilmes que explicava os mecanismos pelos quais os microrganismos aderem a materiais vivos e não vivos (DONLAN, 2002).

O biofilme é definido como um agregado de microrganismos de uma única espécie bacteriana ou de diferentes espécies e gêneros de bactérias que se desenvolvem em superfície inertes ou tecidos vivos envolvidos por uma matriz extracelular polimérica (EPS) (DONLAN, 2002; STEPANOVIĆ *et al.*, 2000). A matriz corresponde por cerca de 90% da massa seca do biofilme e apenas 10% correspondem aos microrganismos. A EPS e proporciona ao biofilme a arquitetura tridimensional, a adesão à superfície e a coesão (FLEMMING; WINGENDER, 2010). A matriz de EPS é uma substância secretada pelas bactérias envolvidas no biofilme, composta por uma parte solúvel contendo polissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA extracelular e uma parte insolúvel com amiloides, celulose, fimbria, pili e flagelos (ZOGAJ *et al.*, 2001; FLEMMING; WINGENDER, 2010; FLEMMING *et al.*, 2016).

A formação do biofilme em superfícies biótica e abióticas envolve cinco etapas: (1) adesão inicial ou reversível da bactéria à superfície, (2) ligação irreversível com crescimento e divisão bacteriana, (3) maturidade com a produção da matriz extracelular (4) desenvolvimento da colônia e (5) dispersão de células colonizadoras (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008; WOOD, 2009; WINKELSTRÖTER *et al.*, 2014). A adesão

inicial ocorre por estímulos ambientais e as fases seguintes são guiadas pelo *quorum sensing* (AGUILAR-ROMERO *et al.*, 2010).

A capacidade de a célula planctônica realizar a adesão inicial depende de fatores extrínsecos como temperatura, pH, oxigênio e nutrientes presentes no ambiente e de fatores intrínsecos como sensibilidade ao ambiente, expressão de genes que codificam para motilidade (flagelo), adesão (curli e outras proteínas) (AGUILAR-ROMERO *et al.*, 2010). O desenvolvimento em superfícies abióticas é altamente dependente das interações físico-químicas, eletrostáticas, hidrodinâmicas (superfície ar-líquido) e interações hidrofóbicas entre o envelope bacteriano e o substrato. Os movimentos gerados pelos flagelos ajudam a superar essas barreiras (BELOIN ; RE; GHIGO, 2005; GOLLER; ROMEO, 2008). Entretanto, isolados imóveis conseguem aderir-se através da alta expressão da adesina *curli* (BELOIN; RE; GHIGO, 2005). A rugosidade e a hidrofobicidade da superfície podem aumentar a adesão. Superfícies hidrofóbicas como teflon e plásticos são mais propensas à colonização, quando comparadas ao aço inoxidável e ao vidro que são hidrofílicos (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008). A ligação inicial ainda é fraca, e as bactérias são facilmente removidas pela aplicação de força de cisalhamento, obtida durante os processos de lavagem, porém a rugosidade da superfície pode protegê-las desse processo.

Na fase da adesão irreversível os microrganismos começam a secretar substâncias envolvidas na manutenção da adesão do biofilme. A Fimbria tipo 1 ou pili tem papel na adesão não específica a superfícies abióticas, a *curli* aumenta a capacidade de adesão superficial e interação entre as células, e o antígeno 43 é uma adesina autotransportadora de superfície que afeta a morfologia de colônias mediando a autoagregação (adesão célula-célula) conduzindo ao desenvolvimento tridimensional da arquitetura do biofilme e ao desenvolvimento de microcolônias que favorecem a maturação do biofilme (BELOIN; RE; GHIGO, 2005; BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008; HOBLEY *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2016).

A maturação corresponde ao início da secreção da matriz extracelular que proporciona o desenvolvimento da estrutura tridimensional do biofilme. Este processo leva à formação de um ambiente físico-químico heterogêneo em que as bactérias apresentam traços fisiológicos característicos que as distinguem de suas contrapartes planctônicas principalmente devido a interações célula-célula (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008; SHARMA *et al.*, 2016). Os três principais exopolissacarídeos envolvidos no desenvolvimento da matriz de *E. coli* são ácido colânico, celulose e β -1,6-N-acetil-D-

glucosamina, que colaboram para a rigidez e a proteção do biofilme (BELOIN; RE; GHIGO, 2005).

O desprendimento pode ocorrer como resultado da degradação enzimática da matriz de biofilme e do *quorum sensing* em resposta a alterações ambientais relacionadas a níveis de nutrição e depleção de oxigênio por alguma força externa (SHARMA *et al.*, 2016). São conhecidos três modos de dispersão de biofilmes: erosão, consiste na liberação contínua de células isoladas ou de pequenos agrupamentos de células em níveis baixos ao longo da formação do biofilme; desprendimento, na qual são liberadas grandes porções, geralmente durante os estágios posteriores; sementeira, na qual há uma liberação rápida de um grande número de células isoladas ou de pequenos aglomerados de células de cavidades ocas que se formam dentro da colônia (KAPLAN, 2010; CAPPITELLI; POLLO; VILLA, 2014).

As estruturas dos biofilmes maduros são variadas podem estar organizadas em camadas, aglomerados e sulcos ou estarem dispostas em estruturas mais complexas como hastes e em formações semelhantes a cogumelos (WINKELSTRÖTER *et al.*, 2014). A arquitetura dos biofilmes é heterogênea e está constantemente remodelando-se através de enzimas específicas que degradam e reconfiguram a sua conformação (WHITFIELD; MARMONT; HOWELL, 2015). Esse processo é importante para a adaptação às diversas mudanças que ocorrem no ambiente e na dispersão de agregados celulares e recolonização (FLEMMING *et al.*, 2016).

Moléculas de EPS mediam a formação da arquitetura do biofilme e produzem a formação espacial na qual as bactérias presentes formam grupos de microcolônias (NEU; LAWRENCE, 2015). Serra e colaboradores demonstraram que biofilmes de *E. coli* estão divididos em duas camadas com funções distintas: otimização do crescimento e otimização da manutenção e da sobrevivência (SERRA; RICHTER; HENGGE, 2013). As estratificações da camada possuem gradientes diferentes de nutriente, oxigênio, pH, metabólitos bacterianos, moléculas de sinalização e crescimento e metabolismo das bactérias (STEWART; FRANKLIN, 2008). Além de concentrar os nutrientes do ambiente, conectar as microcolônias e fortalecer as interações dessas com a superfície, a matriz de EPS exerce diversas funções de proteção, contra dissecação, radiação UV, antibióticos e do sistema imune do hospedeiro (MILANOV *et al.*, 2015). As microcolônias separam-se umas das outras por vazios intersticiais denominados canais de água (DOLAN, 2002). Pelos canais de água são carreados resíduos bacterianos, enzimas,

nutrientes, metabólitos, oxigênio e até mesmo de antimicrobianos por todas as camadas do biofilme (AGUILAR-ROMERO *et al.*, 2010).

O principal componente proteico da matriz é a curli (HOBLEY *et al.*, 2015). A curli pertence à classe de fibras amiloides (BARNHART; CHAPMAN, 2006). A fimbria curli é codificada por dois *operons* divergentes, *csgABC* e *csgDEFG* (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008). *csgB* constitui o componente estrutural menor e *csgA* o maior, *csgC* é a proteína periplasmática acessória, *csgD* regula a produção de curli e celulose, o *csgE* e *csgF* são genes que codificam proteínas putativas acessórias e o *csgG* é uma proteína translocadora (RÖMLING; GALPERIN, 2015). Como um fator de virulência a curli contribui para adesão e internalização dos patógenos nas células epiteliais (MILANOV *et al.*, 2015). No biofilme, as funções da curli são adesão inicial à superfície, agregação intercelular e formação da estrutura tridimensional (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008; SERRA; RICHTER; HENGGE, 2013; MILANOV *et al.*, 2015). Bactérias deficientes na síntese de curli formam biofilmes planos, que formam-se linearmente e não desenvolvem camadas (BARNHART; CHAPMAN, 2006). Na maioria das enterobactérias a síntese de curli ocorre em temperatura ambiente, inferior a 30°C (MILANOV *et al.*, 2015).

A celulose bacteriana e a vegetal são iguais, ambas consistem de monômeros de glicose conectados entre si por ligações glicosídicas β -(1→4) (RÖMLING, 2005; RE; GHIGO, 2006; WHITNEY; HOWELL, 2013; RÖMLING; GALPERIN, 2015). A celulose, juntamente com a curli contribui para a formação do biofilme de *E. coli*, sendo essencial para a resistência à dissecação e a elasticidade (GUALDI *et al.*, 2008; HOBLEY *et al.*, 2015). Contudo, quando expressa em grandes quantidades ela inibe a formação do biofilme, possivelmente por esconder a curli, envolvendo-a no excesso de celulose (GUALDI *et al.*, 2008). O mesmo ocorre em relação à virulência. A celulose pode estar presente em cepas que causam doenças agudas. Entretanto, se um isolado produzir uma quantidade elevada de celulose isso diminui sua virulência (RÖMLING; GALPERIN, 2015). A produção de celulose está diretamente ligada à habilidade de formar biofilme rígido em superfícies ar-líquido, entretanto essa característica pode variar entre isolados e é altamente dependente das condições ambientais (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008). A biosíntese da celulose é codificada em dois *operons* distintos: *yhjR-bcsQABZC* e *bcsEFG* (ZOGAJ *et al.*, 2001; RÖMLING, 2005). As proteínas BcsA e BcsB formam as duas subunidades do complexo de celulose sintase que está localizado dentro da membrana e que converte UDP-glicose em celulose (HOBLEY *et al.*, 2015). A síntese de celulose é regulada indiretamente pelo gene *csgD* (RÖMLING, 2005).

A formação de biofilme pode ser avaliada quantitativa e qualitativamente através do uso de microplaca de titulação de 96 poços de fundo chato, no qual o biofilme pode se formar no fundo e na parede dos poços. A densidade óptica do biofilme estabelecido é determinada por espectrofotometria (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000; COENYE; NELIS, 2010)

Quando os isolados são cultivados em meio contendo corante Vermelho Congo é possível observar se há expressão de fímbria curli e de celulose (RÖMLING, 2005). Estas estruturas interagem com o corante Vermelho Congo permitindo a detecção de ambas quando presentes, de forma individual ou combinada (RÖMLING, 2005; MILANOV *et al.*, 2015). O corante azul de comassie ajuda na discriminação mais precisa dos diferentes morfotipos descritos por Römling (2005) e Bokranz *et al.* (2005): rdar (colônias vermelhas ou violetas, secas e rugosa, que produzem fímbria curli e celulose), pdar (colônias rosas, secas e rugosas, que produzem somente celulose), bdar (colônias marrons, secas e rugosas que produzem somente fímbria curli), saw (colônias brancas e lisas que não expressam esses componentes da matriz), bas (colônias marrons e lisas que expressam somente fímbria curli), e pas (colônias rosas e lisas que expressam somente celulose) (MILANOV *et al.*, 2015). A habilidade de expressar morfotipo rdar é essencial para a sobrevivência de bactérias patogênicas fora dos organismos hospedeiros, mas também é significativa para a patogênese de certas infecções (MILANOV *et al.*, 2015). Rdar também está associado à formação de biofilme em poliestireno, uma superfície plástica e hidrofóbica, mas também no vidro que por ser hidrofílico é menos propenso à colonização (UHLICH; COOKE; SOLOMON, 2006).

A celulose tem a habilidade de ligar-se a corantes químicos fluorescentes dessa forma a síntese de celulose pode ser avaliada de forma exclusiva em meio contendo calcoflúor, no qual a celulose produzida emite fluorescência visível sob luz UV 366 nm (RÖMLING *et al.*, 2003; BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008)

2.6 Biofilme e saúde pública

A colonização das superfícies na indústria alimentar pode acarretar em diversos problemas tanto econômicos quanto de saúde pública. A falta de eficiência nos procedimentos de higienização ou limpeza favorece a adesão microbiana e o desenvolvimento do biofilme (RODRIGUES; MARTINIS; TEIXEIRA, 2012).

Os biofilmes podem se formar em diversas superfícies, tais como plástico, metal, vidro, solo e madeira (WINKELSTRÖTER *et al.*, 2014). Entretanto, formam-se mais facilmente em superfícies rugosas, não polares e hidrofóbicas, como teflon e plásticos, do que em superfícies hidrofílicas como vidros e metais (DONLAN, 2002). Superfícies plásticas estão presentes nos aviários no encanamento de água e nos abatedouros em placas de corte de carnes e encanamento onde podem ser fontes de transmissão de importantes patógenos avícolas, incluindo *E. coli*. (SKYBERG *et al.*, 2007). Além disso, o biofilme aumenta a resistência das bactérias no ambiente. A entrada e a difusão de antimicrobianos na matriz do biofilme são difíceis, pois a incorporação dos biocidas através da estrutura ocorre lentamente (AZEVEDO; CERCA, 2012; GIÃO; VIEIRA; AZEVEDO, 2012). Deste modo as células sésseis podem ser até 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos do que as células planctônicas (RODRIGUES; MARTINIS; TEIXEIRA, 2012).

O biofilme fornece o ambiente ideal pra troca de DNA extracromossomal (plasmídeo) entre as cepas (HUNG *et al.*, 2013). A conjugação ocorre a uma maior taxa entre as células em biofilmes do que entre as células planctônicas, devido ao ambiente formado proporcionar um contato mais estreito célula-célula (DOLAN, 2002). Os biofilmes são de especial interesse na indústria avícola e em saúde pública, uma vez que podem albergar microrganismo patogênicos e facilitam a aquisição de plasmídeos que podem aumentar a virulência e a resistência a antimicrobianos e a desinfetantes (SKYBERG *et al.*, 2007). Esses isolados mais resistentes e patogênicos podem se disseminar de animal para animal através dos trabalhadores ou de equipamentos como comedouros e bebedouros (AGUILAR-ROMERO *et al.*, 2010).

APEC causam significantes perdas econômicas para a produção e para a indústria avícola, pois são difíceis de erradicar tanto na limpeza entre lotes dos aviários quanto nas higienizações dos abatedouros frigoríficos, possivelmente devido a sua habilidade de formar biofilmes associado à resistência a desinfetantes (OOSTERIK *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2010).

A presença de biofilme no ambiente de processamento de alimentos das indústrias é um importante fator de risco, devido à potencial fonte de contaminação microbiana dos alimentos, que pode levar a perdas econômicas pela deterioração do alimento, redução do tempo de prateleira e aumento das chances de ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA's). As bactérias quando estão em biofilmes geralmente exibem maior resistência aos desafios do ambiente como a luz ultravioleta, desidratação, tratamento

antimicrobiano, limpeza e saneamento, o que faz com que sua eliminação seja mais difícil (RODRIGUES *et al.*, 2010; STEPANOVIĆ *et al.*, 2000; WINKELSTRÖTER *et al.*, 2014).

Atualmente os meios mais eficientes para limitar o crescimento microbiano incluem boa higiene na produção, funcionamento racional da linha de processamento e o uso efetivo de sanitizantes e desinfetantes (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). Contudo os microrganismos dentro dos biofilmes são mais resistentes aos desinfetantes e biocidas do que suas células planctônicas e essa característica pode estar associada a aspectos relacionados à arquitetura e à fisiologia dos biofilmes, como redução da difusão, crescimento anaeróbio, alterações fisiológicas devido ao crescimento reduzido, produção de enzimas que degradam as substâncias antimicrobianas (RODRIGUES; MARTINIS; TEIXEIRA, 2012). Devido a esses fatores, os desinfetantes mais comuns usados pelas indústrias de alimentos, não tem sido eficiente para remover os biofilmes (SREY; JAHID; SANG-DO, 2013).

A combinação de sanitizantes com outros métodos é necessária. A tecnologia de vapor quente e o desinfetante em aerossol apresentam um potencial uso para a remoção de biofilmes em superfícies ambientais devido sua capacidade de penetrar e alcançar locais difícil acesso. Um bom exemplo dessa combinação é processo chamado “Clean-In-Place”, que consiste em limpeza e desinfecção por meio de processos mecânicos, térmicos e químicos e é utilizado principalmente em plantas de fabricação de laticínios (WINKELSTRÖTER *et al.*, 2014).

Devido a maior resistência dos biofilmes aos processos de limpeza e desinfecção, novos meios de controle estão sendo pesquisados. O uso de peróxido de oxigênio (H_2O_2) mostrou-se eficiente para inibir a formação de biofilme na concentração de 500mg/L e removeu biofilmes maduros na concentração de 800mg/L (SREY; JAHID; SANG-DO, 2013). O uso de surfactante em superfícies tem sido mostrado como uma forma eficiente de evitar a adesão microbiana. Os surfactantes têm características estruturais gerais com a presença de uma estrutura hidrófila e hidrofóbica, que podem ajudar a melhorar as ações de limpeza física através da emulsificação, penetração, espalhamento, formação de espuma e molhamento (WINKELSTRÖTER *et al.*, 2014). Os bacteriófagos também são potenciais candidatos para eliminar patógenos em biofilmes bacterianos, visto que podem difundir-se através da matriz de biofilme, mantendo a sua eficácia antibacteriana. Os fagos naturais e modificados são eficazes contra os biofilmes de bactérias patogênicas

transmitidas pelos alimentos (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010; BRIDIER *et al.*, 2015).

Outra alternativa para risco de resíduos na carne e a resistência a desinfetantes é o desenvolvimento de materiais atóxicos, resistentes, que não deixem resíduos e que possam entrar em contato com o alimento e água que inibam a colonização microbiana e por consequência a instalação do biofilme. As modificações de superfície usando nanomateriais como a prata, o cobalto e os óxidos mistos de ferro são interessantes candidatos para a prevenção no contexto de tecnologias de tratamento para água potável. Assim como modificação do vidro e do polietileno com organossilano parece promissora como uma opção de revestimentos para materiais que entram em contato com a água potável, devido as suas propriedades antibacterianas (CAPPITELLI; POLO; VILLA, 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizado em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

3.1 Microrganismos

Foram utilizadas 241 isolados de *E. coli* provenientes de lesões de celulite, de doenças respiratórias e de camas de aviários (Tabela 1) pertencentes à bacterioteca do CDPA. As cepas estavam estocadas em caldo infusão cérebro e coração (BHI, Oxoid®, Inglaterra) com glicerol em proporção 4:1, a -80°C.

Tabela 1 - Distribuição dos isolados conforme as origens de isolamento.

Origem	Isolados
Lesões de Celulite	131
Cama de aviários	61
Doenças respiratórias	46
Desconhecida	3
Total	241

Os IP *in vivo* dos 241 isolados foram previamente estabelecidos por Souza *et al.* (2016).

3.2 Quantificação da produção de biofilme

A metodologia utilizada foi adaptada de Stepanovic *et al.* (2007). Para o experimento as cepas foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24h. Depois foram semeadas em Ágar Triptona de Soja (TSA, Oxoid®, Inglaterra) e incubadas a 37°C por 24h. Após a incubação três a cinco colônias do TSA foram inoculadas em solução salina a 0,85% para ajustar a turbidez a 0,5 da escala de McFarland, obtendo um inóculo de aproximadamente 10⁸ UFC/mL (STEPANOVIC *et al.*, 2007).

O teste de produção de biofilme foi realizado em microplacas de titulação de poliestireno de 96 poços com fundo chato (Kasvi[®], Itália). Primeiramente foram pipetados 180µL de caldo Triptona de Soja sem glicose (TSB, Difco[®], Estados Unidos da América) em 90 poços de cada placa. Os outros seis poços serviram de controle negativo e receberam 200µL de TSB cada um. Após foram adicionados 20µL de cada inóculo previamente preparado, em triplicata. As placas foram incubadas aerobicamente a 25°C por 24h. Depois da incubação o conteúdo dos poços foi aspirado e descartado. As placas foram lavadas três vezes com 250µL de solução salina 0,85% para remover células bacterianas que não tenham se aderido à placa. Após secagem das placas foram adicionados 200µL metanol (Synth[®], Brasil) por 20 minutos para a fixação das bactérias aderidas à placa. Retirado o metanol, as placas foram novamente secas e coradas com de 200µL cristal violeta de Hucker 2% por 15 minutos. Após as placas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de corante. Depois da secagem das placas foram adicionados 200µL de ácido acético glacial 33% para a ressolubilização do corante, permitindo que a quantidade absorvida pelas células bacterianas seja mensurada por absorbância. A absorbância foi medida após decorrida uma hora da adição do ácido acético glacial 33% e foi realizada na leitora de ELISA (ELX800, Biotek[®], EUA) com filtro de 550nm.

A densidade ótica (OD_a) de cada amostra é obtida pela média das absorbâncias dos três poços em que cada uma foi inoculada, esse valor é então comparado a média das absorbâncias do controle negativo somada a três vezes o desvio padrão do controle negativo (OD_{cn}). A determinação da produção de biofilme é dada pela seguinte classificação (STEPANOVIĆ *et al.*, 2007): não produtora de biofilme ($OD_a \leq OD_{cn}$), fraca produtora de biofilme ($OD_{cn} < OD_a \leq 2 \times OD_{cn}$), moderada produtora de biofilme ($2 \times OD_{cn} < OD_a \leq 4 \times OD_{cn}$) e forte produtora de biofilme ($4 \times OD_{cn} < OD_a$).

3.3 Avaliação da expressão fenotípica de celulose e fímbria curli dos isolados de *Escherichia coli* em vermelho congo

A determinação dos morfotipos dos isolados foi realizada através da semeadura dos microrganismos em placas de ágar Vermelho Congo (VC) composto por 40µg/mL Vermelho Congo (Sigma-Aldrich[®], Estados Unidos da América) e 20µg/mL Azul Coomassie (Sigma-Aldrich[®], Estados Unidos da América), meio Luria Bertani com baixo

teor de sal (LB, Sigma-Aldrich®, Estados Unidos da América) e 1,6% de Ágar bacteriológico (HiMedia® Laboratories, Índia). As placas com os isolados foram incubadas a 25°C e a 37°C por 96h para que se pudesse observar a influência da temperatura na expressão desses componentes da matriz. As avaliações foram realizadas em duplicatas e repetidas três vezes.

As colônias foram classificadas conforme os morfotipos descritos por Römling *et al.* (2000) e Bokranz *et al.* (2005): rdar (colônias vermelhas ou violetas, secas e rugosa, que produzem fimbria curli e celulose), pdar (colônias rosas, secas e rugosas, que produzem somente celulose), bdar (colônias marrons, secas e rugosas que produzem somente fimbria curli), saw (colônias brancas e lisas que não expressam esses componentes da matriz), bas (colônias marrons e lisas que expressam somente fimbria curli), e pas (colônias rosas e lisas que expressam somente celulose).

3.4 Teste de produção de celulose dos isolados da *Escherichia coli* em calcoflúor

Para confirmar se havia a produção de celulose, os isolados foram semeados em meio Calcoflúor, composto por LB com baixo teor de sal, 1,6% de ágar bacteriológico e 50µM de Fluorescent Brightener 28 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América). Os meios foram incubados a 25°C por 48h e 37°C por 24h. Os testes foram avaliados em duplicata com três repetições concomitantes com a avaliação morfológica em VC.

3.5 Análises estatísticas

Os resultados de frequência absoluta e relativa das amostras, classificadas conforme a capacidade de produção de biofilme e a morfologia dos isolados, foram obtidos por meio da análise estatística descritiva.

Os teste não-paramétrico do Qui-quadrado (χ^2), Teste Exato de Fisher e de Kruskal-Wallis foram utilizados para análise da distribuição dos isolados conforme a produção de biofilme e para determinar se existe associação entre a capacidade de produção de biofilme e o IP, a origem (doenças respiratórias, lesões de celulite e coma de aviário) e a morfologia. O programa PASW Statistics 18 foi utilizado para as análises, adotando-se como referência o nível de significância de 5%.

O teste *t* foi utilizado para determinar se existe associação entre a produção da celulose e da fimbria curli com as temperaturas de crescimento de 25°C e de 37°C. O

programa STATA 14.8 foi utilizado para análise, adotando-se o nível de significância de 1%.

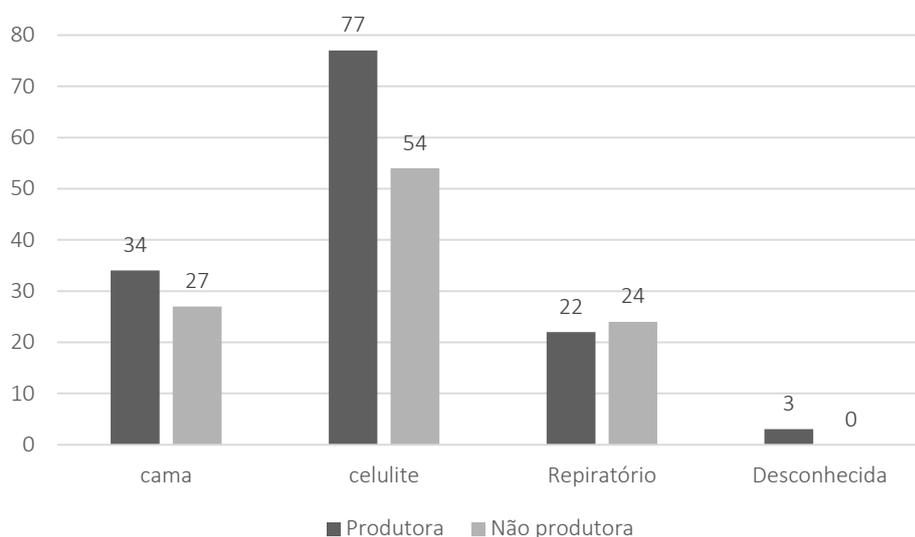
4 RESULTADOS

4.1 Quantificação da Produção de Biofilme

Em relação à produção de biofilme em placas de poliestireno por isolados de APEC observou-se que 136 (56,4%) isolados produziram e 105 (43,6%) não produziram biofilme. Das cepas formadoras 111 (81,6%) delas foram classificadas como fracamente formadoras, 21 (15,4%) como moderadamente formadoras e quatro (2,9%) fortemente formadoras.

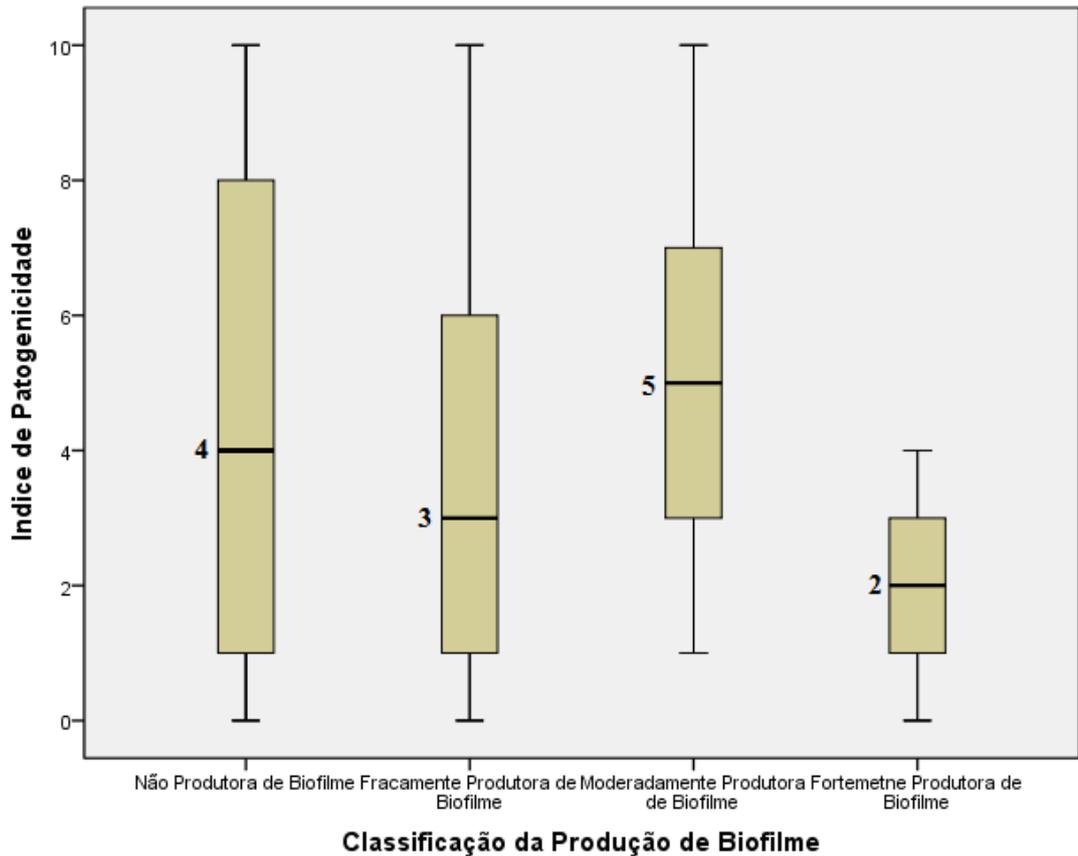
Em relação a produção de biofilme conforme a origem de isolamento das cepas observou-se a formação destas estruturas em 55,7% dos isolados de cama de aviário, 58,8% daquelas oriundas de lesões de celulite e em 47,8% dos isolados de lesões respiratórias (Gráfico 1). No ensaio de produção de biofilme em placa de 96 poços de microtitulação não houve diferença entre a origem da cepa e a capacidade de formação de biofilme ($p>0,05$).

Gráfico 1 – Produção de biofilme dos 241 isolados de *Escherichia coli* de acordo com a origem de isolamento.



A média do IP dos isolados não produtores de biofilme foi quatro, a dos fracamente produtores três, a dos moderadamente produtores cinco e a dos fortemente produtores dois. A classificação dos isolados conforme a produção de biofilme de acordo com o IP está demonstrada no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Distribuição dos isolados não produtoras, fracamente, moderadamente e fortemente produtora de biofilme em relação ao índice de patogenicidade.

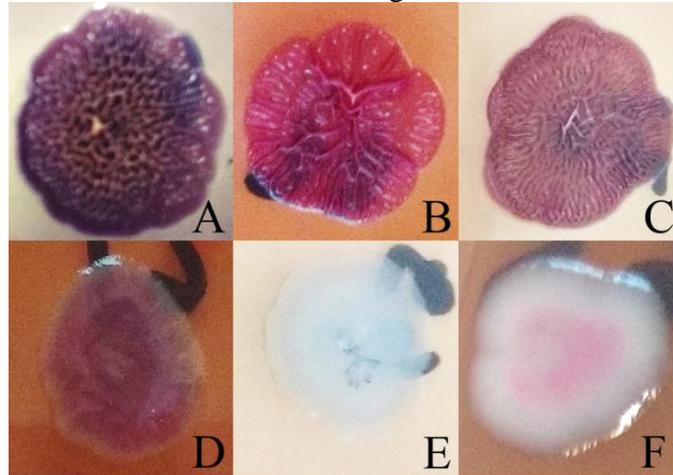


Quando comparamos a capacidade de produção de biofilme e IP *in vivo* não foi encontrada nenhuma tendência quanto à capacidade (não produtora e produtora) ou à quantidade (fraca, moderada, forte ou não produtora) de produção de biofilme em nenhum dos índices de patogenicidade ($p > 0,05$).

4.2 Avaliação da expressão fenotípica de celulose e fímbria curli dos isolados de *Escherichia coli* em vermelho congo

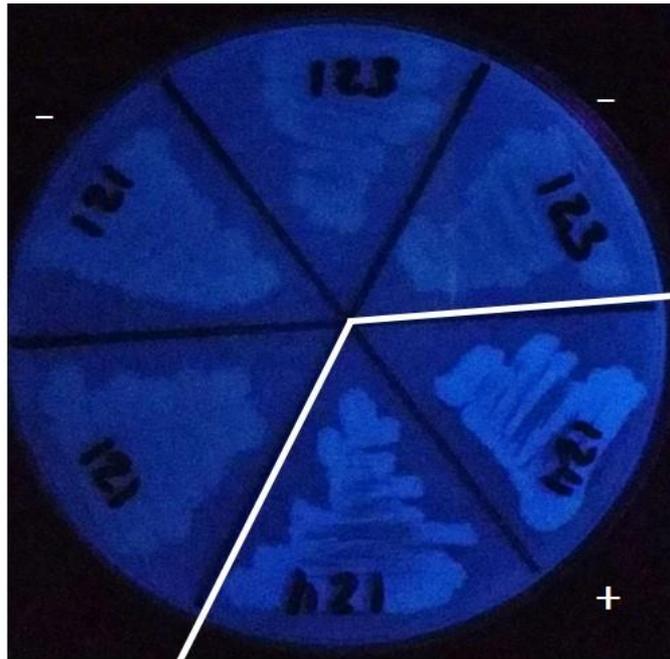
As cepas de *E. coli* apresentaram os morfotipos rdar, pdar, bdar, pas, bas e saw (Fotografia 1) nas duas temperaturas testadas (25°C e 37°C). As amostras classificadas como rdar, pdar e pas também foram positivas na detecção fenotípica no meio Calcoflúor (Fotografia 2).

Fotografia 1 - Morfotipos de *E. coli* em ágar Vermelho Congo a 25°C e 37°C.



Rdar (A), pdar (B), bdar (C), bas .(D), saw (E) e pas (F).

Fotografia 2 - Fenótipos de *E. coli* em ágar Calcoflúor, a 25°C e 37°C



(+) isolados expressam celulose, (-) isolados não expressam celulose.

A distribuição dos isolados por morfotipos foi avaliada nas temperaturas 25°C (Gráfico 3) e 37°C (Gráfico 4). Os isolados foram avaliados pelo componente expressado (curli, celulose ou ambos) e a produção de biofilme (Gráfico 5).

Gráfico 3 - Distribuição dos isolados por classificação morfológica a 25°C.

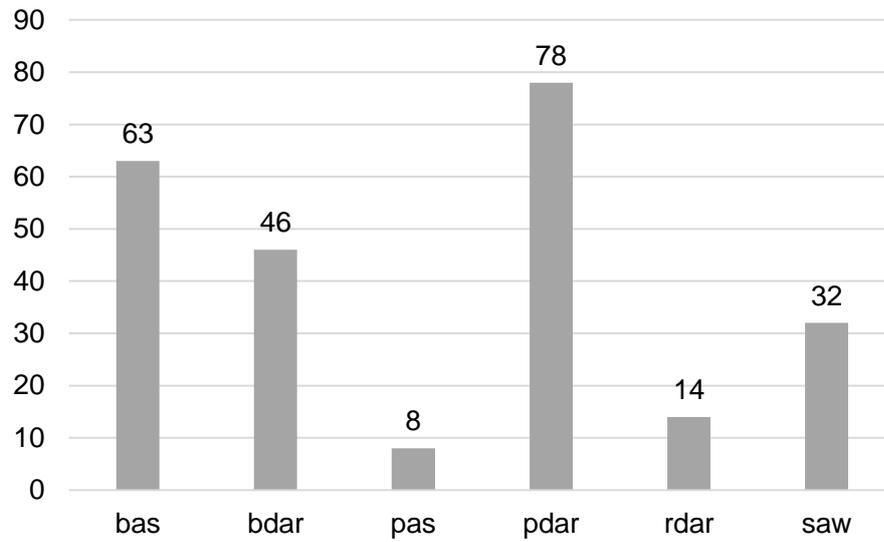


Gráfico 4 - Distribuição dos isolados por classificação morfológica a 37°C.

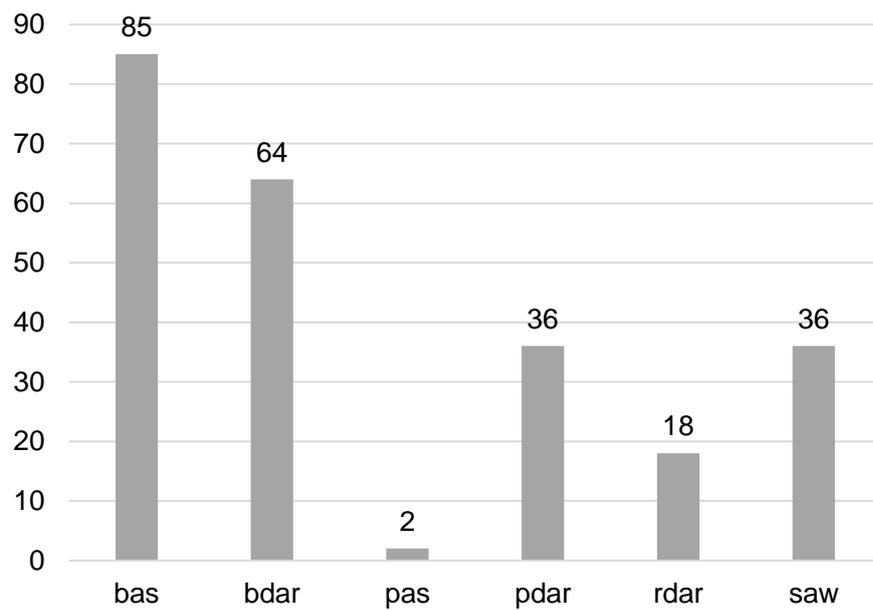
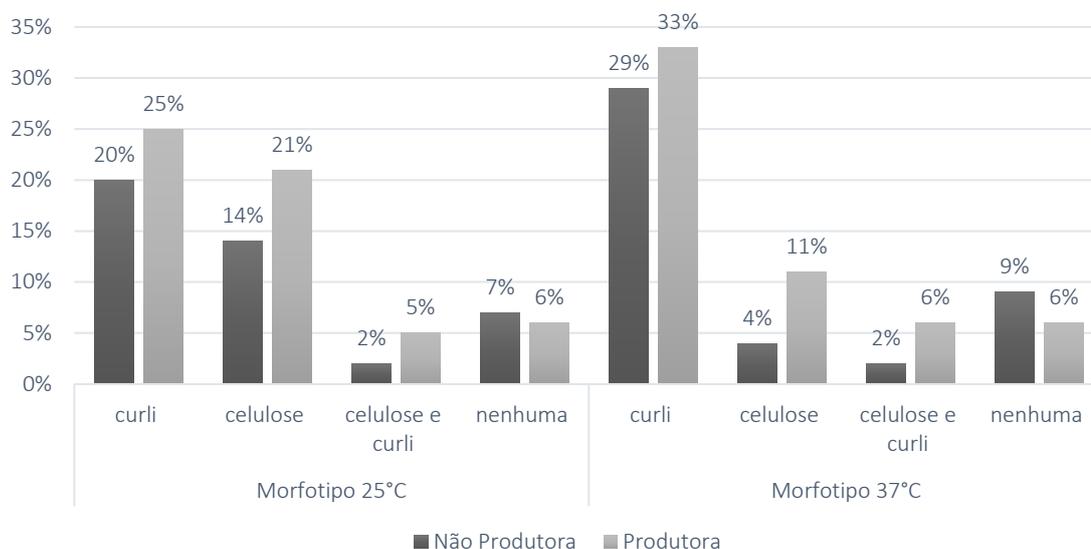


Gráfico 5 - Distribuição dos isolados conforme o componente expressado e a produção de biofilme a 25°C e a 37°C.



Neste trabalho 11,6% dos isolados não foram capazes de expressar nenhum dos componentes a 25°C e a 37°C e 88,4% expressaram um ou ambos os em pelo menos uma das temperaturas no teste morfológico. Apesar de todos os morfotipos estarem presentes nas duas temperaturas testadas e o número de isolados que expressaram pelo menos uma das estruturas do EPS foram semelhantes, 209 cepas a 25°C e 205 a 37°C, houve uma mudança no padrão de expressão desses componentes. A 25°C, 86 isolados expressando celulose, enquanto que a 37°C esse número diminuiu para 38 representando uma diferença significativa ($p < 0,01$). Por outro lado, houve uma significativa maior expressão de curli a 37°C do que a 25°C ($p < 0,01$). Embora a maioria das enterobactérias sintetizem curli em temperatura ambiente (MILANOV *et al.*, 2015), a maioria das cepas de APEC expressou a 37°C independentemente da origem de isolamento.

Nas cepas de APEC o morfotipo rdar não ocorreu somente em temperatura ambiente, 18 isolados apresentaram este morfotipo a 37°C, sendo oito cepas de lesões de celulite, sete de cama de aviário, duas de doenças respiratórias e uma de origem desconhecida. Dessas, quatro não formaram biofilme, apesar de expressar o mesmo morfotipo. Entre bactérias com o morfotipo saw, algumas foram capazes de formar biofilme de forma fraca ou moderadamente formadoras. Evidenciando que alterações no tipo de meio e superfície influenciam na expressão dessas estruturas da matriz. Contudo 159 isolados exibiram o mesmo morfotipo nas temperaturas testadas.

No Anexo A encontra-se a lista com as informações de origem, IP, produção de biofilme e morfotipo de cada um dos isolados deste experimento

5 DISCUSSÃO

Ao longo dos últimos anos o grupo de pesquisa do CDPA trabalha desenvolvendo metodologias que demonstram variações na patogenicidade de bactérias de importância em sanidade avícola e em medicina humana através do estabelecimento do índice de patogenicidade. Até o momento foram estabelecidos protocolos para, *Samonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *Pasteurella multocida* e *E. coli* (LIMA *et al.*, 2016; PILATTI *et al.*, 2016; SOUZA, *et al* 2016). Com esta ferramenta podemos monitorar a patogenicidade, acompanhando as flutuações que possam ocorrer em um determinado período de tempo. Com isto podemos avaliar os eventos que porventura aconteçam nos lotes da criação avícola. Com o uso do IP poderemos associar o aumento ou a diminuição da patogenicidade com eventos ocorridos ao longo do tempo. Como por exemplo: vacinas modificadas que são usadas nas aves em um ambiente fechado (aviário), sujeito as mutações naturais incontrolláveis. Sem um indicador de variação de patogenicidade, como o IP, fica difícil suspeitar que bactéria, como *E. coli*, repentinamente apresente patogenicidade fora do esperado nas monitorizações rotineiras que podem ser feitas pelo CDPA baseado nos trabalhos descritos. O estudo da produção de biofilme *E. coli* corrobora com esses trabalhos já desenvolvidos no CDPA, sendo mais uma fonte de informação do comportamento e das características deste microrganismo.

Os isolados de *E. coli* deste estudo foram capazes de formar biofilme em meio líquido sem enriquecimento de nutrientes. Assim como no trabalho de Skyberg *et al.* (2007) também não houve diferença entre a origem de isolamento e a formação de biofilme neste tipo de meio. Contudo, quando os meios eram enriquecidos os isolados ambientais foram mais produtores que aqueles causadores de doença.

Nenhum outro estudo havia comparado a habilidade de formação de biofilme com IP *in vivo* para *E. coli*. Nossos dados demonstram que a habilidade das cepas de *E. coli* em formar biofilme é altamente variável, não havendo uma tendência específica em relação à patogenicidade e à origem. Outros trabalhos realizados no CDPA nesta mesma linha de pesquisa, mas com outros microrganismos, também não encontraram relação entre a formação de biofilme, patogenicidade e origem dos isolados (dados não publicados).

A fimbria curli é o principal componente da estrutura da matriz do biofilme da *E. coli* e a celulose é o segundo (ZOGAJ *et al.*, 2001). Ambos são importantes para persistência da comunidade bacteriana no ambiente, fornecem estrutura, proteção contra

o ressecamento e interação entre os agregados celulares (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008; GUALDI *et al.*, 2008; HOBLEY *et al.*, 2015).

A expressão de curli e celulose gera o morfotipo rdar, e a ocorrência deste fenótipo é importante para a sobrevivência da bactéria fora do organismo (ZOGAJ *et al.*, 2001; MILANOV *et al.*, 2015). Os isolados com esse comportamento agregativo apresentam maior resistência a sanitizantes (UHLICH; COOKE; SOLOMON, 2006).

A caracterização do biofilme como ferramenta de pesquisa microbiológica e epidemiológica é muito interessante, uma vez que permite que uma grande quantidade de informações que seja obtida. Contudo, o método de microplaca utilizado possui algumas limitações, pois ele foi avaliado como monoespécie, e os biofilmes encontrados no ambiente são em geral multiespécies. Além disso, as variáveis testadas no experimento são limitadas quando comparadas às diversas situações ambientais pelas quais os microrganismos passam até o estabelecimento do biofilme, como variações de temperatura, pH, fluxo de água e nutrientes disponíveis (SKYBERG *et al.*, 2007; CAPPITELLI; POLO; VILLA, 2014). Além desses fatores, diversos trabalhos demonstram que tanto a produção quanto a morfologia dos biofilmes são fatores extremamente variáveis por mudanças mínimas de temperatura, pH, nutrientes disponíveis e oxigênio (RÖMLING *et al.*, 1998; DONLAN, 2002; BELOIN; GHIGO, 2005; BOKRANZ *et al.*, 2005; COSTERTON, 2007; SKYBERG *et al.*, 2007; BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010; OOSTERIK *et al.*, 2014; MILANOV *et al.*, 2015; FLEMMING *et al.*, 2016). No entanto, o método de microplaca é amplamente utilizado nos estudos de biofilme e proporciona a investigação de um grande número de amostras simultaneamente (STEPANOVIĆ *et al.*, 2007; COENYE; NELIS, 2010). E a metodologia de baixo custo, pois requer uma pequena quantidade de reagentes (COENYE; NELIS, 2010). Entretanto, é muito trabalhoso, visto que para avaliação da formação de biofilme em 24h foram necessários quatro dias e cada cepa precisa ser cultivada em triplicada sendo necessária ainda três repetições para conclusão do resultado. Todo esse processo aumenta seu custo, não sendo viável para ser utilizado em monitorias.

Todavia, o fato de que foram encontradas cepas de APEC produtoras de biofilme à temperatura ambiente e em meio com depleção de nutrientes, sendo muitas delas produtoras de componentes do EPS é interessante. Estas condições são encontradas nos sistemas de água nas instalações de produção avícola e em indústrias de alimentos (DO AMARAL, 2004; SKYBERG *et al.*, 2007). Uma vez que a transferência de plasmídeos é

aumentada em biofilmes, os encanamentos de água podem ser uma origem de *E. coli* resistente a antibióticos e com grande capacidade de causar infecções (SKYBERG *et al.*, 2007)

6 CONCLUSÃO

1. Não há associação entre a capacidade e a quantidade na produção de biofilme e o índice de patogenicidade *in vivo* de isolados de APEC.
2. Não há associação entre as origens de isolamento dos isolados de APEC e a capacidade e a quantidade de biofilme.
3. Os isolados de APEC são capazes de apresentarem todas as morfologias em meio Vermelho Congo nas temperaturas de 25°C e 37°C. O morfotipo pdar foi o mais frequente a 25°C e o bas a 37°C.
4. A expressão de celulose ocorre com mais frequência a 25°C do que a 37°C. A expressão de fimbria curli ocorre com mais frequência a 37°C do que a 25°C.

REFERÊNCIAS

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual de Atividades 2015**, São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>>. Acesso em: 16 set. 2016.

AGUILAR-ROMERO, F. *et al.* Bacterial biofilms: Importance in animal diseases. **Current Research, Technology and Education in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Spain, FORMATEX, v. 1, n. 2, p. 2010, p. 700–703 (Microbiology Books Series).

ANDREATTI FILHO, R. L.; Colibacilose Aviária. In: _____. **Saúde aviária e doenças**. ed. 1, São Paulo, Roca, 2007, p. 112-117.

AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. Matriz dos biofilmes: o truque para sobreviver nas mais hostis condições ambientais. In: _____. **Biofilmes: na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. 1 ed. Porto, Publindústria, 2012, cap. 4, p. 23-25.

BARNES, H. J.; NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J. P. Colibacillosis. In: Calnek, B. D. (Ed.) **Diseases of poultry**. 12th ed. Ames, University Press, 2008, cap. 18, p. 691-738

BARNHART, M. M.; CHAPMAN, M. R. Curli Biogenesis and Function. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 131–147, 2006.

BAUCHART, P. *et al.* Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli* - Search for factors involved in host specificity or zoonotic potential. **Microbial Pathogenesis**, v. 49, n. 3, p. 105–115, 2010.

BELOIN, C.; GHIGO, J. M. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 16–19, 2005.

BELOIN, C.; RE, S. DA; GHIGO, J. Colonization of Abiotic Surfaces. **EcoSal Plus**, v. 1, n. 2, p. 1–26, 2005.

BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J. M.; *Escherichia coli* Biofilms. In: ROMEO, T. (ed). **Bacterial Biofilms** 1th ed., Berlin, Springer, 2008, v. 322, cap. 12, p. 250-279 (Current Topics in Microbiology and Immunology).

BHUNIA, A. K. *Escherichia coli*. In: _____. (ed) **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis**, West Lafayette, IN, Springer, 2008, cap. 10, p. 183–200.

BOKRANZ, W. *et al.* Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 1171–1182, 2005.

BRIDIER, A. *et al.* Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, v. 45, n. PB, p. 167–178, 2015.

CAPPITELLI, F.; POLO, A.; VILLA, F. Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled. **Food Engineering Reviews**, v. 6, n. 1-2, 2014.

COENYE, T.; NELIS, H. J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 2, p. 89–105, 2010.

COSTERTON, J. W. Toward a Unified Biofilm Theory. In: ____ (Ed.) **The Biofilm Primer**. 2007. Berlin, Springer, 2007, cap. 5, p. 169-180 (Springer Series on Biofilms)

COSTERTON, J. W. *et al.* Microbial Biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, v. 49, p. 711–745, 1995.

DO AMARAL, A. L. Drinking Water as a Risk Factor to Poultry Health. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 4, p. 191–199, 2004.

.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

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**, v. 37, n. 4, p. 355–366, 2008.

EWERS, C. *et al.* Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 104, n. 1–2, p. 91–101, 2004.

EWERS, C.; LI, G. *et al.* Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they?. **Int J Med Microbiol**. v. 267, n. 3, p. 163-176, 2007.

EWERS, C. *et al.* Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 184–192, 2009.

FERREIRA, A. J. & KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JR, et al. **Doença das aves**. Campinas, FACTA, 2009, cap. 9, p. 197-205.

FLEMMING, H.C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–33, 2010.

GIÃO, M. S.; VIEIRA, M. J.; AZEVEDO, N. F. Biofilmes em condutas de água potável. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. **Biofilmes: na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. 1 ed. Porto, Publindústria, 2012, cap. 17, p. 163-171.

GOLLER, C. C.; ROMEO, T. Environmental Influences on Biofilms Development. In: ROMEO, T. (ed). **Bacterial Biofilms**. 1 ed. Berlin, Springer, 2008, cap. 3, p. 38-57.

GUABIRABA, R.; SCHOULER, C. Avian colibacillosis: Still many black holes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 15, p. 1-7 2015.

GUALDI, L. *et al.* Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 154, n. 7, p. 2017–2024, 2008.

HOBLEY, L. *et al.* Giving structure to the biofilm matrix: An overview of individual strategies and emerging common themes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 5, p. 649-669, 2015.

HUNG, C. *et al.* *Escherichia coli* biofilms have an organised and complex extracellular matrix structure. **mBio**, v. 4, n. 5, p. 1-10, 2013.

JOHNSON, L. C. *et al.* The influence of *Escherichia coli* strains from different sources and the age of broiler chickens on the development of cellulitis. **Avian pathology**, v. 30, n. 5, p. 475–479, 2001.

JOHNSON, T. J. *et al.* Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3987–3996, 2008.

KAPLAN, J. B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 205–218, 2010.

KEMMETT, K. *et al.* A Longitudinal Study Simultaneously Exploring the Carriage of APEC Virulence Associated Genes and the Molecular Epidemiology of Faecal and Systemic *E. coli* in Commercial Broiler Chickens. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

KNÖBL, T., *et al.* Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Clone Harboring *sfa* Gene in Brazil. **The Scientific World Journal**. v. 2012, article ID 437312, 2012.

LAWLEY, R.; CURTIS, L.; DAVIS, J. Biological Hazards. In: ____ **The Food Safety Hazard Guidebook**. ed.2, Londos, Springer, 2012, cap. 1, p. 7-126.

LIMA, D.A. *et al.* Establishment of a pathogenicity index in *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium strains inoculated in one-day-old broiler chicks; **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.68, n.2, p.257-264, 2016.

MILANOV, D. *et al.* RDAR morphotype: A resting stage of some *Enterobacteriaceae*. **Food and Feed Research**, v. 42, n. 1, p. 43–50, 2015.

NAKAZATO, G. *et al.* Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479–486, 2009.

NEU, T. R.; LAWRENCE, J. R. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 233–242, 2015.

OOSTERIK, L. H. *et al.* Effect of serogroup, surface material and disinfectant on biofilm formation by avian pathogenic *Escherichia coli*. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 561–565, 2014.

PASQUALI, F. *et al.* Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates of animal and environmental origins from an integrated poultry production chain. **Veterinary Microbiology**, v. 178, n. 3–4, p. 230–237, 2015.

PILATTI, R.M.I. *et al.* Establishment of a Pathogenicity Index for One-dayold Broilers to *Pasteurella multocida* Strains Isolated from Clinical Cases in Poultry and Swine. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.18, n.2, p. 255-260, 2016.

QUINN, P. J. *et al.* Família *Enterobacteriaceae*. In: QUINN, P. J., MARKEY, B. K., CARTER, M. E. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**, 1 ed. Porto Alegre, Artmed, 2005, cap. 18, p. 115-130.

RE, D. S.; GHIGO, J. A CsgD-Independent Pathway for Cellulose Production and Biofilm Formation in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 188, n. 8, p. 3073–3087, 2006.

RODRIGUES, D.; DE MARTINIS, E.; TEIXEIRA, P. Biofilmes na indústria alimentar. In: AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. **Biofilmes: na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. 1 ed. Porto, Publindústria, 2012, cap. 18, p. 173-186

RODRIGUES, L. B. *et al.* Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1082–1085, 2010.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E. *et al.* Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v. 151, n. 6, p. 2097–2110, 2005.

RÖMLING, U. Cellular and Molecular Life Sciences Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in *Enterobacteriaceae*. **CLMS**, v. 62, p. 1234–1246, 2005.

RÖMLING, U. *et al.* Curli Fibers Are Highly Conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with Respect to Operon Structure and Regulation. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 3, p. 722–731, 1998.

RÖMLING, U. *et al.* Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *International journal of medical microbiology*. **IJMM**, v. 293, n. 4, p. 273–285, 2003.

RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y. Bacterial cellulose biosynthesis: Diversity of operons, subunits, products, and functions. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 9, p. 545–557, 2015.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 1753–4, 2000.

SERRA, D. O.; RICHTER, A. M.; HENGGE, R. Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 24, 2013.

SHARMA, G. *et al.* *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 309–319, 2016.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573–583, 2010.

SINGER, R. S. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: Evidence and data gaps. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. FEB, p. 1–9, 2015.

SKYBERG, J. A. *et al.* Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 548–554, 2007.

SOUZA, G. F. *et al.* Classification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* by a Novel Pathogenicity Index Based on an Animal Model. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1347, p. 1–6, 2016.

SREY, S.; JAHID, I. K.; SANG-DO, H. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572–585, 2013.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 428–432, 2004.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 199–210, 2008.

UHLICH, G. A.; COOKE, P. H.; SOLOMON, E. B. Analyses of the Red-Dry-Rough Phenotype of an *Escherichia coli* O157 : H7 Strain and Its Role in Biofilm Formation and Resistance to Antibacterial Agents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2564–2562, 2006.

WHITFIELD, G. B.; MARMONT, L. S.; HOWELL, P. L. Enzymatic modifications of exopolysaccharides enhance bacterial persistence. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, p. 1–21, 2015.

WHITNEY, J. C.; HOWELL, P. L. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 63-72, 2013.

WINKELSTRÖTER, L. K. *et al.* Unraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 1, p. 35–46, 2014.

WOOD, T. K. Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from whole-transcriptome profiling. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2009.

ZHAO, J. *et al.* *Escherichia coli* toxin gene *hipA* affects biofilm formation and DNA release. **Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 633–640, 2013.

ZOGAJ, X. *et al.* The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 6 p. 1452–1463, 2001.

ANEXO A – Informações sobre origem de isolamento, IP, produção de biofilme e morfológico por isolados.

Isolado	Origem	IP	Produção de biofilme	Morfológico 25°C/37°C	Isolado	Origem	IP	Produção de biofilme	Morfológico 25°C/37°C
1	celulite	6	Não Produtora	bas/bas	71	cama	3	Moderada	bdar/bdar
3	cama	2	Fraca	bdar/bdar	72	cama	0	Fraca	pdar/pdar
4	cama	2	Fraca	pdar/bas	73	celulite	10	Moderada	pdar/bas
5	cama	1	Não Produtora	pdar/bdar	74	celulite	10	Não Produtora	bas/bas
6	celulite	10	Não Produtora	bas/bas	75	celulite	10	Fraca	bas/bas
7	celulite	10	Fraca	bdar/bdar	76	celulite	10	Fraca	bdar/bdar
9	celulite	10	Fraca	bas/bas	77	cama	2	Fraca	pdar/pdar
10	cama	0	Não Produtora	bdar/pdar	79	cama	2	Não Produtora	saw/saw
11	celulite	3	Moderada	pdar/bdar	80	celulite	8	Fraca	pdar/pdar
14	celulite	2	Forte	bas/bas	81	celulite	8	Não Produtora	pdar/pdar
15	celulite	5	Fraca	bas/bas	82	celulite	2	Fraca	rdar/bdar
16	celulite	10	Não Produtora	bas/bas	83	celulite	7	Fraca	rdar/rdar
17	celulite	10	Não Produtora	bas/bas	84	cama	2	Fraca	pdar/rdar
18	celulite	10	Fraca	bdar/pdar	85	cama	1	Fraca	rdar/rdar
19	cama	2	Não Produtora	saw/saw	86	celulite	10	Não Produtora	bdar/bdar
21	celulite	9	Não Produtora	saw/saw	87	celulite	1	Fraca	bas/bas
22	celulite	7	Não Produtora	pdar/bdar	88	celulite	5	Fraca	bdar/rdar
23	celulite	10	Fraca	bdar/pdar	90	cama	4	Moderada	pdar/pdar
27	celulite	4	Fraca	pdar/bdar	91	celulite	4	Fraca	rdar/rdar
28	celulite	6	Fraca	pdar/bdar	92	celulite	1	Não Produtora	pdar/bas
31	cama	4	Fraca	pdar/pdar	93	celulite	3	Moderada	pdar/bdar
33	celulite	9	Não Produtora	bas/bas	94	cama	4	Não Produtora	pdar/bdar
34	celulite	3	Fraca	bdar/bdar	95	cama	3	Fraca	pdar/bas
35	celulite	3	Fraca	pdar/pdar	96	celulite	3	Fraca	bas/saw
36	cama	1	Fraca	pdar/pdar	97	celulite	3	Fraca	bdar/pdar
37	celulite	7	Não Produtora	saw/saw	99	cama	2	Não Produtora	bas/bas
38	celulite	6	Não Produtora	saw/saw	101	cama	4	Fraca	bdar/bdar
39	celulite	6	Não Produtora	saw/saw	102	celulite	2	Moderada	bas/bas
40	celulite	6	Não Produtora	saw/saw	103	celulite	5	Moderada	pdar/pdar
41	cama	2	Não Produtora	pdar/pdar	104	celulite	2	Fraca	pdar/pdar
42	celulite	8	Não Produtora	pdar/bdar	105	cama	2	Fraca	pdar/bdar
43	celulite	9	Não Produtora	pdar/pdar	106	cama	1	Fraca	saw/saw
44	celulite	7	Fraca	saw/saw	107	celulite	6	Fraca	bdar/pdar
45	celulite	7	Não Produtora	rdar/rdar	108	celulite	10	Não Produtora	bas/bas
46	cama	5	Moderada	pdar/bas	110	celulite	4	Fraca	bas/bas
48	celulite	2	Não Produtora	bas/bas	111	celulite	3	Fraca	pdar/bdar
49	celulite	3	Não Produtora	pdar/pdar	116	celulite	0	Fraca	bas/bas
51	celulite	9	Não Produtora	bas/bas	117	celulite	0	Não Produtora	saw/saw
52	celulite	6	Não Produtora	pas/pas	120	cama	0	Fraca	bdar/bas
55	cama	1	Moderada	saw/saw	121	celulite	2	Não Produtora	pas/saw
56	celulite	10	Não Produtora	pdar/pdar	123	celulite	0	Fraca	bdar/saw
57	celulite	3	Fraca	pdar/pdar	124	celulite	1	Fraca	pdar/pdar
59	celulite	6	Fraca	pdar/pdar	125	celulite	3	Não Produtora	pdar/bdar
61	celulite	9	Não Produtora	bas/bas	126	celulite	7	Fraca	bdar/bas
65	cama	2	Não Produtora	saw/saw	127	celulite	2	Fraca	bdar/bdar
66	cama	1	Não Produtora	saw/saw	128	celulite	1	Fraca	pdar/bdar
67	celulite	10	Fraca	bdar/bas	129	cama	0	Não Produtora	pdar/bdar
68	celulite	5	Não Produtora	rdar/rdar	130	celulite	4	Não Produtora	bas/bas
69	celulite	6	Moderada	saw/saw	131	celulite	0	Fraca	pdar/bas
70	celulite	8	Moderada	saw/saw	134	cama	1	Não Produtora	saw/saw

Cama: cama de aviário, celulite: Lesão de celulite, desconhecido: origem desconhecida e respiratório: doença respiratória.

Isolado	Origem	IP	Produção de biofilme	Morfológico 25°C/37°C	Isolado	Origem	IP	Produção de biofilme	Morfológico 25°C/37°C
135	celulite	0	Fraca	pdar/pdar	215	cama	6	Não Produtora	pdar/bdar
136	celulite	5	Fraca	bas/bas	216	cama	0	Fraca	bdar/bas
141	celulite	1	Não Produtora	pdar/bdar	217	celulite	5	Fraca	pdar/bdar
142	celulite	2	Não Produtora	bdar/bdar	218	celulite	3	Não Produtora	bdar/saw
143	cama	0	Não Produtora	bdar/bdar	222	celulite	6	Não Produtora	bas/saw
145	celulite	9	Não Produtora	pdar/bdar	223	celulite	9	Fraca	bdar/bas
146	celulite	0	Forte	bdar/bdar	224	celulite	8	Não Produtora	saw/saw
148	cama	0	Não Produtora	pdar/bdar	225	celulite	2	Fraca	bdar/bdar
149	celulite	8	Fraca	bdar/bdar	230	cama	10	Não Produtora	bas/bas
153	cama	1	Fraca	pdar/bdar	240	celulite	6	Não Produtora	bdar/bdar
155	celulite	1	Fraca	bdar/bas	241	cama	9	Não Produtora	bas/bas
157	celulite	1	Não Produtora	pdar/pdar	242	celulite	8	Não Produtora	pdar/pdar
158	cama	0	Não Produtora	saw/saw	245	celulite	3	Fraca	saw/saw
159	celulite	1	Não Produtora	saw/saw	246	cama	1	Não Produtora	pdar/bdar
160	celulite	0	Não Produtora	bas/bas	251	celulite	2	Fraca	pdar/bdar
165	celulite	1	Não Produtora	bas/bdar	254	cama	4	Fraca	pdar/bdar
166	celulite	2	Forte	pdar/rdar	255	cama	1	Não Produtora	bdar/bdar
169	celulite	2	Não Produtora	saw/bas	256	Desconhecida	1	Fraca	pdar/pdar
170	celulite	4	Não Produtora	bdar/bdar	257	Desconhecida	4	Fraca	rdar/rdar
172	celulite	1	Fraca	bdar/bdar	258	celulite	2	Não Produtora	pdar/bas
173	celulite	7	Fraca	bas/bas	263	celulite	8	Fraca	pdar/bdar
174	celulite	3	Fraca	bdar/bdar	264	celulite	3	Fraca	pdar/pdar
175	celulite	1	Não Produtora	pdar/bdar	265	cama	1	Não Produtora	bas/bas
176	celulite	1	Fraca	pdar/bdar	274	Desconhecida	1	Fraca	pdar/pdar
177	cama	1	Fraca	bdar/saw	276	celulite	2	Não Produtora	pdar/pdar
178	cama	0	Não Produtora	saw/saw	277	cama	7	Não Produtora	bas/bas
179	celulite	2	Fraca	pdar/bdar	281	celulite	6	Fraca	rdar/rdar
180	celulite	8	Fraca	bas/bas	282	celulite	9	Fraca	bas/bas
181	celulite	8	Fraca	bas/bas	283	celulite	10	Moderada	saw/bas
182	celulite	1	Fraca	pdar/pdar	284	celulite	1	Não Produtora	rdar/rdar
183	cama	3	Não Produtora	rdar/rdar	287	celulite	7	Fraca	pdar/bdar
184	cama	1	Fraca	bdar/bdar	288	celulite	1	Fraca	saw/saw
185	celulite	7	Moderada	bdar/bdar	289	celulite	5	Moderada	bdar/bdar
186	celulite	6	Não Produtora	bas/bas	290	cama	2	Fraca	bas/bas
187	celulite	7	Não Produtora	bas/bas	293	cama	2	Fraca	bas/bas
189	cama	0	Fraca	pdar/pdar	296	cama	0	Fraca	pdar/bdar
190	cama	0	Não Produtora	bdar/bdar	298	cama	0	Não Produtora	pdar/saw
191	celulite	1	Moderada	pdar/bas	299	cama	1	Fraca	bdar/bdar
192	celulite	7	Fraca	bdar/bdar	302	cama	1	Fraca	rdar/rdar
193	cama	4	Moderada	pdar/pdar	303	cama	1	Não Produtora	saw/saw
194	cama	3	Fraca	saw/saw	306	cama	2	Fraca	bdar/rdar
196	celulite	9	Não Produtora	pdar/bdar	312	celulite	2	Fraca	bas/bas
198	celulite	10	Não Produtora	bas/bas	314	cama	4	Fraca	rdar/rdar
205	cama	1	Fraca	bdar/rdar	317	cama	4	Não Produtora	bdar/bdar
206	celulite	0	Não Produtora	pdar/bdar	318	cama	4	Fraca	pdar/pdar
207	celulite	8	Fraca	bas/bas	1R	Respiratório	3	Fraca	saw/saw
211	celulite	1	Fraca	bas/bas	2R	Respiratório	9	Não Produtora	bas/bas
212	celulite	6	Fraca	pas/bas	3R	Respiratório	1	Não Produtora	bas/bas
213	celulite	3	Não Produtora	bas/bas	4R	Respiratório	10	Não Produtora	bas/bas
214	celulite	4	Fraca	bdar/saw	5R	Respiratório	4	Não Produtora	bas/bas

Cama: cama de aviário, celulite: Lesão de celulite, desconhecido: origem desconhecida e respiratório: doença respiratória.

Isolado	Origem	IP	Produção de biofilme	Morfológico 25°C/37°C
6R	Respiratório	6	Não Produtora	bas/bas
7R	Respiratório	6	Fraca	bdar/bdar
8R	Respiratório	7	Moderada	bas/bas
10R	Respiratório	4	Fraca	saw/saw
12R	Respiratório	5	Fraca	saw/saw
13R	Respiratório	9	Fraca	bas/bas
14R	Respiratório	2	Moderada	bas/bas
19R	Respiratório	9	Fraca	pdar/rdar
20R	Respiratório	6	Fraca	bas/bdar
21R	Respiratório	4	Fraca	saw/bas
22R	Respiratório	6	Não Produtora	pdar/bdar
23R	Respiratório	7	Não Produtora	pas/bas
24R	Respiratório	7	Não Produtora	pas/bas
25R	Respiratório	2	Não Produtora	bas/bas
26R	Respiratório	5	Não Produtora	bas/bas
27R	Respiratório	3	Fraca	pdar/pdar
28R	Respiratório	3	Fraca	bas/bas
31R	Respiratório	1	Não Produtora	bas/bas
33R	Respiratório	1	Moderada	pas/bas
35R	Respiratório	2	Fraca	bas/bas
36R	Respiratório	7	Moderada	pas/bas
37R	Respiratório	10	Fraca	bas/bas
38R	Respiratório	4	Forte	pdar/pdar
40R	Respiratório	8	Não Produtora	bas/bas
42R	Respiratório	7	Fraca	pdar/pas
43R	Respiratório	9	Fraca	rdar/bdar
44R	Respiratório	6	Moderada	saw/bas
45R	Respiratório	10	Não Produtora	bdar/bdar
49R	Respiratório	4	Não Produtora	pdar/bas
50R	Respiratório	8	Não Produtora	bdar/bdar
51R	Respiratório	8	Não Produtora	saw/saw
52R	Respiratório	10	Não Produtora	pdar/bas
53R	Respiratório	2	Não Produtora	bas/bas
55R	Respiratório	1	Não Produtora	pdar/bdar
58R	Respiratório	6	Não Produtora	pas/bas
59R	Respiratório	7	Não Produtora	bas/bas
60R	Respiratório	6	Fraca	bas/bas
61R	Respiratório	9	Não Produtora	bas/bas
62R	Respiratório	8	Não Produtora	pdar/pdar
63R	Respiratório	10	Fraca	rdar/rdar
64R	Respiratório	3	Não Produtora	bas/bas

Cama: cama de aviário, celulite: Lesão de celulite, desconhecido: origem desconhecida e respiratório: doença respiratória.