

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Jonas Fernandes Maciel**

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE ISOLADOS  
DE *Escherichia coli* ORIUNDOS DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO**

Santa Maria, RS  
2017

**Jonas Fernandes Maciel**

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE ISOLADOS  
DE *Escherichia coli* ORIUNDOS DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Agueda Castagna de Vargas

Santa Maria, RS  
2017

**Jonas Fernandes Maciel**

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE ISOLADOS  
DE *Escherichia coli* ORIUNDOS DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**

**Aprovado em 09 de março de 2017:**

---

**Agueda Castagna de Vargas, Dra.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Franciele Maboni Siqueira, Dra. (UFRGS)**

---

**Letícia Beatriz Matter, Dra. (URI)**

---

**Letícia Trevisan Gressler, Dra. (UPF)**

---

**Márcio Garcia Ribeiro, Dr. (UNESP)**

Santa Maria, RS  
2017

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, em sua infinita sabedoria, pela coragem e serenidade proporcionada a mim para enfrentar os desafios que me foram impostos.

À minha família, meus pais Nilda e Olavo e meus irmãos Jean e Carmencita, pela força e apoio ao longo desses anos e por entenderem minha ausência em certos momentos.

À minha orientadora Agueda Castagna de Vargas por acreditar no meu potencial, pelo exemplo de pessoa e de profissional. Não existem palavras para expressar minha gratidão.

À família LABAC, minha segunda casa, sempre me ajudando e apoiando em todos os momentos dessa caminhada. Letícia, Leti Matter, Claudinha, Cacá, Rô, Giovana, Ananda, Evelyn, Valessa, Bibi, Monique, Cláudia, Magdiel, Dani, Elise, Adriana, Bruna, e todos aqueles que passaram por essa família, vocês têm um lugar guardado no meu coração.

Às professoras Fernanda Silveira Flores Vogel, coordenadora do PPGMV, e Sonia de Ávila Botton pelo apoio que me deram em um dos momentos mais difíceis dessa trajetória.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) pela oportunidade de realizar um curso de doutorado com conceito máximo em uma universidade pública e de qualidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento à essa pesquisa.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, o meu muito obrigado!

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* ORIUNDOS DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO

AUTOR: Jonas Fernandes Maciel  
ORIENTADOR: Agueda Castagna de Vargas

*Escherichia coli* apresenta grande plasticidade genética, e possui a capacidade de colonizar diferentes nichos, causando infecções entéricas e extraentéricas. O presente estudo objetivou caracterizar genotípica e fenotipicamente isolados de *E. coli* oriundos de animais de produção (bovinos, ovinos, equinos e aves). A análise genotípica consistiu de classificação em grupos filogenéticos; pesquisa de fatores de virulência, como fímbrias (F4, F5, F6, F18 e F41) e toxinas (LT, STa, STb e STx2), e curli (*csgA*) e celulose (*bcsA*) para os isolados associados à mastite bovina e fezes de bezerros com e sem diarreia; além da pesquisa de 29 genes relacionados à virulência do patótipo APEC (*E. coli* patogênica aviária) em dois isolados extraintestinais de *E. coli* associados a um surto de colisepticemia em aves. A análise fenotípica foi composta pela expressão de curli e celulose e formação de biofilme *in vitro* nos isolados de *E. coli* de mastite bovina e de fezes de bezerros com e sem diarreia; e ainda teste de susceptibilidade aos antimicrobianos em todos os isolados, com avaliação da produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) para os isolados associados à mastite bovina. A classificação filogenética dos isolados de *E. coli* possibilitou verificar a maior predominância de filo-grupos comensais. A proporção de filo-grupos foi a seguinte: (i) mastite bovina: A (50%), B1 (30%), B2 (3,3%), C (6,7%), D (3,3%) e F (6,7%); (ii) fezes de bezerros sem diarreia: B1 (83,3%), E (10%) e desconhecidos (6,7%); (iii) fezes diarreicas de bezerros: B1 (70%), B2 (3,33%), C (3,33%), D (3,33%), E (13,33%) e desconhecidos (6,7%); (iv) subpopulações de *E. coli* de bezerros sem diarreia: B1 (93,3%), B2 (20%) e E (46,7%); (v) subpopulações de *E. coli* de bezerros diarreicos: A (6,7%), B1 (80%), D (33,3%) e E (40%); (vi) fezes de potros: A (4,62%), B1 (50,77%), C (15,38%), E (21,54%), F (1,54%) e desconhecidos (6,15%); (vii) fezes de cordeiros: A (6,15%), B1 (81,54%), C (10,77%) e E (1,54%); e (viii) isolados extraintestinais de *E. coli* de aves: A (100%). Quanto à presença de fímbrias e toxinas, os isolados de mastite bovina foram negativos para esses fatores, não havendo relação com isolados clínicos intestinais. Os isolados de *E. coli* de fezes de bezerros apresentaram resultados variáveis: (i) sem diarreia: presença de toxinas STb (66,7%), LT (56,7%) e STa (33,3%) e ausência de fímbrias; (ii) diarreicos: toxinas LT (23,3%), STa (3,3%), STb (3,3%) e STx2 (3,3%) e fímbrias F5 (16,7%) e F18 (13,3%). As frequências dos genes *csgA* e *bcsA* foram: (i) isolados *E. coli* oriundos de mastite bovina: 48% e 34% respectivamente; (ii) isolados oriundos de fezes de bezerros sem diarreia: 96,7% e 83,3% e (iii) isolados associados à diarreia: 90% para ambos os genes. Em relação aos isolados de *E. coli* extraintestinais oriundos de septicemia em ave, ambos apresentaram diversos fatores de virulência associados ao patótipo APEC, divergindo em adesinas: *hrlA/hek*; invasinas: *gimB*; sistemas de aquisição de ferro: *sitD ep.* e *fyuA*; toxinas: *sat* e *hlyA*, caracterizando uma coinfeção. A formação de biofilme *in vitro* foi observada em 10% dos isolados associados à mastite, sendo que a expressão de curli e celulose também foi verificada nesses isolados. Entre os isolados de bezerros sem diarreia, 83,3% expressaram curli e celulose, e entre os isolados de bezerros diarreicos 100% de expressão. Entre os isolados intestinais, a formação de biofilme foi verificada em um único isolado oriundo de bezerros sem diarreia. Resistência aos antimicrobianos foi observada em isolados de todas as espécies animais neste estudo, destacando-se os isolados de mastite bovina, que apresentaram maior resistência à tetraciclina (46%) e ampicilina (40%), com 24% de isolados multirresistentes e 10% ESBL, e os isolados associados a diarreias em bezerros, os quais apresentaram maior resistência à tetraciclina (63,3%), ampicilina (50%), estreptomomicina (50%) e sulfonamida (46,7%), sendo 53,3% multirresistentes. Os isolados de *E. coli* avaliados no presente estudo apresentaram taxas de resistência que acompanham tendências mundiais, fortemente associado ao uso não racional de antimicrobianos na produção animal.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, grupos filogenéticos, fatores de virulência, resistência antimicrobiana, animais de produção.

## ABSTRACT

### GENOTYPIC AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF *Escherichia coli* ISOLATES FROM LIVESTOCK

AUTHOR: Jonas Fernandes Maciel  
ADVIDOR: Agueda Castagna de Vargas

*Escherichia coli* is a component of intestinal microbiota of animals and humans, with ability to colonize different niches, causing enteric and extra-enteric infections. Presents genetic plasticity through by acquisition and loss of genes, resulting in genotypic and phenotypic differences among them. Genotypic and phenotypic characterization of *E. coli* isolates from farm animals (cattle, sheep, horses and broilers) was performed. The genotypic analysis was composed by phylogenetic classification; search for virulence factors – fimbriae (F4, F5, F6, F18 and F41) and toxins (LT, STa, STb and STx2), curli (*csgA*) and cellulose (*bcsA*) – from isolates associated with bovine mastitis and feces of calves with and without diarrhea; besides the research of 29 genes related to the virulence of APEC pathotype (avian pathogenic *E. coli*) on two extraintestinal *E. coli* isolates from an avian colisepticemia outbreak. Phenotypic analysis was performed by curli and cellulose expression and biofilm formation of *E. coli* isolates from bovine mastitis and feces of calves with and without diarrhea; and antimicrobial susceptibility testing in all isolates, with evaluation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in isolates from bovine mastitis. The majority of *E. coli* isolates belonged commensal phylo-groups: (i) bovine mastitis: A (50%), B1 (30%), B2 (3.3%), C (6.7%), D (3.3%) and F (6.7%); (ii) feces of calves without diarrhea: B1 (83.3%), E (10%) and unknown (6.7%); (iii) feces of diarrheic calves: B1 (70%), B2 (3.33%), C (3.33%), D (3.33%), E (13.33%) and unknown (6.7%); (iv) *E. coli* subpopulations of calves without diarrhea: B1 (93.3%), B2 (20%) and E (46.7%); (v) *E. coli* subpopulations of diarrheic calves: A (6.7%), B1 (80%), D (33.3%) and E (40%); (vi) feces of foals: A (4.62%), B1 (50.77%), C (15.38%), E (21.54%), F (1.54%) and unknown (6.15%); (vii) feces of lambs: A (6.15%), B1 (81.54%), C (10.77%) and E (1.54%); (viii) extraintestinal *E. coli* isolates: A (100%). No isolates from bovine mastitis were positive for fimbriae and toxins, unrelated to intestinal clinical isolates. *E. coli* isolates from calves feces presented variable results: (i) without diarrhea: STb (66.7%), LT (56.7%) and STa (33.3%) toxins and no fimbriae; (ii) diarrheic: LT (23.3%), STa (3.3%), STb (3.3%) and STx2 (3.3%) toxins and F5 (16.7 %) and F18 (13.3%) fimbriae. The frequencies of *csgA* and *bcsA* genes were: (i) *E. coli* isolates from bovine mastitis: 48% and 34%, respectively; (ii) isolates from feces of calves without diarrhea: 96.7% and 83.3%, respectively; and (iii) isolates associated with diarrhea: 90% for both genes. The extraintestinal *E. coli* isolates from avian colisepticemia outbreak, presented several virulence factors important for Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) related to adhesion (*fimH*, *papC*, *mat*), invasion (*tia*), iron acquisition system (*iroN*) and serum resistance (*iss*, *ompA*, *traT*), but divergence in others (adhesin: *hrlA/hek*; invasin: *gimB*; iron acquisition system: *sitD ep.* and *fyuA*; toxins: *sat* and *hlyA*) characterizing a coinfection. *In vitro* biofilm formation was observed in 10% of the isolates from bovine mastitis, and curli and cellulose expression was verified in these isolates. Among the isolates from calves without diarrhea, curli and cellulose was expressed in 83.3%, and among isolates of diarrheal calves, there was 100% expression. Biofilm formation was verified in a single isolate from calves without diarrhea. Host factors may be to influence gene expression important for this mechanism. Antimicrobial resistance was observed in isolates from all animal species of this study, with emphasis to bovine mastitis isolates, which showed greater resistance to tetracycline (46%) and ampicillin (40%), with 24% and 10% multidrug resistant and ESBL isolates, respectively; and isolates from diarrhea in calves, with greater resistance to tetracycline (63,3%), ampicillin (50%), streptomycin (50%) and sulfonamide (46,7%), with 53,3% multidrug resistant isolates. The resistance rates of *E. coli* isolates in the present study following global trends, associated with the careless use of antimicrobials in animal production.

Key words: *Escherichia coli*, phylogenetic groups, virulence factors, antimicrobial resistance, farm animals.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1 – Árvore de decisão dicotômica para determinar o grupo filogenético de uma cepa de *E. coli* pela utilização dos resultados de amplificação pela PCR dos genes *chuA* e *yjaA* e fragmento de DNA TspE4.C2 (Adaptado de CLERMONT et al., 2000) .....24
- Figura 2 – Esquema de decisão para agrupamento de isolados de *E. coli* em filo-grupos de acordo com os resultados da PCR quadruplex (Adaptado de CLERMONT et al., 2013) .....26

### 5 CAPÍTULO III

- Quadro 1 – Perfil de susceptibilidade *in vitro* de diferentes grupos clonais de *E. coli* de bezerros diarreicos a seis antimicrobianos com maiores taxas de resistência .....66

## LISTA DE TABELAS

### 3 CAPÍTULO I

Table 1 – Virulence genes of <i>E. coli</i> strains isolated from chicken in a colisepticemia outbreak.....	32
---	----

### 4 CAPÍTULO II

Table 1 – Phylogenetic groups found in 130 <i>E. coli</i> clones from 26 strains from feces of healthy foals and lambs.....	51
Table 2 – Susceptibility profile of clones of 5 <i>E. coli</i> strains isolated from feces of healthy foals .....	52
Table 3 – Susceptibility profile of clones of 5 <i>E. coli</i> strains isolated from feces of healthy lambs .....	53

### 5 CAPÍTULO III

Tabela 1 – Diversidade filogenética de grupos clonais de <i>E. coli</i> oriundos de fezes de bezerros sem diarreia.....	64
Tabela 2 – Diversidade filogenética de grupos clonais de <i>E. coli</i> oriundos de bezerros com diarreia.....	65
Tabela 3 – Valores do IRMA dos isolados de <i>E. coli</i> de bezerros diarreicos e dos seus respectivos grupos clonais.....	67

### 6 CAPÍTULO IV

Tabela 1 – Oligonucleotídeos usados para detectar os genes de curli e celulose em isolados de <i>E. coli</i> oriundos de fezes de bezerros saudáveis e diarreicos.....	86
Tabela 2 – Perfil de susceptibilidade de isolados de <i>E. coli</i> oriundos de bezerros saudáveis (n=30) e de bezerros diarreicos (n=30) frente a 15 antimicrobianos....	87
Tabela 3 – Valor do IRMA atribuído aos isolados de <i>E. coli</i> (n=16) considerados multirresistentes ( $p<0,001$ ) oriundos de bezerros diarreicos, agrupados em perfis de resistência para antimicrobianos e classes.....	88

### 7 CAPÍTULO V

Tabela 1 – Oligonucleotídeos usados para detectar os genes curli ( <i>csgA</i> ) e celulose ( <i>bcsA</i> ) em isolados de <i>E. coli</i> obtidos de casos de mastite bovina.....	107
Tabela 2 – Distribuição dos grupos filogenéticos entre os 50 isolados de <i>E. coli</i> de mastite bovina .....	108
Tabela 3 - Perfil de susceptibilidade de 50 isolados de <i>E. coli</i> oriundos de mastite bovina a diferentes antimicrobianos.....	109



Tabela 4 – Valores de IRMA para isolados de <i>E. coli</i> multirresistentes (resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos) obtidos de mastite clínica bovina e comparação da média com a média do IRMA dos isolados sensíveis.....	110
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/E	Attaching and effacing
AMC	Amoxicilina + ácido clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ANOVA	Análise de Variância
APEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Aviária
<i>arpa</i>	Ankyrin-like regulatory protein
<i>astA</i>	EAST1 (heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative <i>E. coli</i> )
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Aztreonam
<i>bcsA</i>	Gene da celulose
<i>bcsABZC</i>	Operon - biogênese da celulose
<i>bdar</i>	brown dry and rough
BFP	bundle-forming pilus
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAZ	Ceftazidima
CFL	Cefalotina
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
<i>chuA</i>	Heme receptor gene
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
<i>cnf</i>	Fator citotóxico necrotizante
CPM	Cefepime
CRO	Ceftriaxona
<i>csgA</i>	Gene do curli
<i>csgB</i>	Proteína do curli
<i>csgBA</i>	Operon - biogênese do curli
<i>csgD</i>	Regulador do curli
<i>csgDEFG</i>	Operon - biogênese do curli
<i>csgE</i>	Proteína do curli
<i>csgF</i>	Proteína do curli
<i>csgG</i>	Proteína do curli
CTF	Ceftiofur
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleotídeos
<i>eae</i>	attaching and effacing gene
ECOR	<i>E. coli</i> Reference Collection
EAF	<i>E. coli</i> Adherence Factor
EAST1	heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative <i>E. coli</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva

ENO	Enrofloxacina
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ERY	Erythromycin
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
EST	Estreptomicina
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
FFC	Florfenicol
<i>fimH</i>	Type 1 fimbriae
FLF	Florfenicol
<i>fyuA</i>	Ferric yersinia uptake
GC-C	Guanilato Ciclase C
GEN	Gentamicina
<i>gimB</i>	Genetic island associated with newborn meningitis
GM	Gentamicin
<i>hlyA</i>	Hemolysin A
<i>hra</i>	Heat-resistant agglutinin
<i>ibeA</i>	Invasion of brain endothelium
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>iha</i>	Iron-regulated-gene-homologue adhesion
<i>ipaB</i>	Invasina <i>ipaB</i>
<i>ipaC</i>	Invasina <i>ipaC</i>
<i>ipaD</i>	Invasina <i>ipaD</i>
<i>ipgA</i>	Proteína chaperona <i>ipgA</i>
<i>ipgC</i>	Proteína chaperona <i>ipgC</i>
<i>ipgE</i>	Proteína chaperona <i>ipgE</i>
<i>ireA</i>	Iron-responsive element
IRMA	Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos
<i>iroN</i>	Catecholate siderophore receptor
<i>irp2</i>	Iron repressible protein
<i>iss</i>	Increased serum survival
<i>iucD1</i>	Aerobactin synthesis
LB	Luria Bertani
LEE	Locus Enterocyte Effacement
<i>lpfA</i>	Long polar fimbriae
LT	Termo-estável
<i>mat</i>	Meningitis associated and temperature regulated fimbriae
MLST	Multilocus sequence typing
<i>mxiE</i>	Transcriptional regulator MxiE
NAL	Ácido nalidíxico
NEO	Neomicina
<i>neuC</i>	K1 capsular polyssacharide
MPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica mamária
NMEC	<i>Escherichia coli</i> associada a meningite neonatal
<i>ompA</i>	Outer membrane protein
<i>pap</i>	Pilus associated with pyelonephritis

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>pdar</i>	pink, dry and rough
PEN	Penicillin
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
PNPD	Programa Nacional de Pós Doutorado
<i>rdar</i>	red, dry and rough
RMA	Resistência Múltipla aos Antimicrobianos
SAS	Statistical Analysis System
<i>sat</i>	Secreted autotransporter toxin
<i>saw</i>	Smooth and White
<i>sfa</i>	S-fimbriae
<i>sfa/foc CD</i>	S/F1C fimbriae
<i>sitD chr.</i>	<i>Salmonella</i> iron transport system gene
<i>sitD ep.</i>	<i>Salmonella</i> iron transport system gene
<i>Spa15</i>	Surface presentation of antigens protein
STa	Termo-estável
STb	Termo-estável
STEC	<i>Escherichia coli</i> shiga toxigência
STx	Shiga Toxina
STX	Trimethoprim-sulfamethoxazole
SUL	Sulfonamida
SUT	Sulfazotrim
TET	Tetraciclina
<i>tia</i>	Toxigenic invasion locus in ETEC
<i>tir</i>	Translocated intimin receptor
<i>traT</i>	Transfer protein
<i>trpA</i>	Tryptophan synthase alpha chain
TSA	Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos
<i>tsh</i>	Temperatura sensitive hemagglutinin
TSS3	Sistema de Secreção Tipo III
TSS6	Sistema de Secreção Tipo VI
TspE4.C2	Fragmento de DNA, gene da lipase esterase
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UK	United Kingdom
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
UV	Ultravioleta
<i>vat</i>	Vacuolating autotransporter toxin
VETEC	<i>Escherichia coli</i> verotoxigênica
<i>virB</i>	Virulence regulon transcriptional activator <i>virB</i>
<i>virF</i>	Virulence regulon transcriptional activator <i>virF</i>
XNL	Ceftiofur
<i>yjaA</i>	<i>yjaA</i> gene

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	14
2.2 PATOTIPOS DE <i>E. coli</i> .....	15
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC) .....	15
2.2.2 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC) .....	17
2.2.3 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora (EIEC) .....	19
2.2.4 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC) .....	19
2.2.5 <i>Escherichia coli</i> shiga toxigênica ou verotoxigênica (STEC/VETEC) .....	20
2.2.6 <i>Escherichia coli</i> patogênica aviária (APEC) .....	20
2.2.7 <i>Escherichia coli</i> uropatogênica (UPEC) .....	22
2.2.8 <i>Escherichia coli</i> patogênica mamária (MPEC) .....	23
2.3 GRUPOS FILOGENÉTICOS DE <i>E. coli</i> .....	23
2.4 CURLI E CELULOSE .....	25
2.4.1 Papel do curli e da celulose na formação de biofilmes .....	26
2.5 PLASTICIDADE GENÉTICA E A RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS POR <i>E. coli</i> .....	27
<b>3 CAPÍTULO I - Virulence factors and antimicrobial susceptibility profile of extraintestinal <i>Escherichia coli</i> isolated from an avian colisepticemia outbreak</b> .....	30
<b>4 CAPÍTULO II - Phylo-typing and in vitro antimicrobial susceptibility testing of clones derived from <i>Escherichia coli</i> isolated from feces of non-diarrheic foals and lambs</b> .....	35
<b>5 CAPÍTULO III - Diversidade genética e padrões de susceptibilidade de populações de <i>Escherichia coli</i> oriundas de bezerros com e sem diarreia</b> .....	54
<b>6 CAPÍTULO IV - Grupos filogenéticos, fatores de virulência e resistência antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> isolada de bezerros com e sem diarreia</b> .....	68
<b>7 CAPÍTULO V - Grupos filogenéticos, fatores de virulência e perfil de susceptibilidade de <i>Escherichia coli</i> isoladas de mastite bovina</b> .....	89
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	111
<b>9 CONCLUSÕES</b> .....	114
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	115
<b>APÊNDICE A</b> .....	124
<b>APÊNDICE B</b> .....	126
<b>APÊNDICE C</b> .....	128

<b>APÊNDICE D.....</b>	<b>130</b>
<b>APÊNDICE E.....</b>	<b>132</b>
<b>APÊNDICE F.....</b>	<b>134</b>
<b>APÊNDICE G.....</b>	<b>136</b>
<b>APÊNDICE H.....</b>	<b>138</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de grandes extensões territoriais, com uma área total de 8.515.767,049 km<sup>2</sup>, e tem na agropecuária uma das suas principais atividades. A agropecuária brasileira apresenta grande relevância no cenário nacional e internacional. É um setor que abastece uma grande população, além de forte fonte de ocupação de mão-de-obra. A pecuária nacional, ao lado da agricultura, é a base para muitas cadeias produtivas de elevado peso no agronegócio (IBGE, 2017). Para o sucesso desta atividade, destaca-se o controle sanitário dos diferentes rebanhos, como forma de prevenir e controlar enfermidades.

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil possui cerca de 213 milhões de cabeças, caracterizando-se como o segundo maior rebanho efetivo do mundo e o maior exportador de carne desde 2004 (BRASIL, 2017). Na produção de leite, ocupa a quinta posição em litros produzidos (35 bilhões) e a segunda em relação ao efetivo de vacas ordenhadas, ficando atrás apenas da Índia (IBGE, 2016).

Na ovinocultura, o rebanho nacional é de aproximadamente 18,41 milhões de animais, com maior representatividade do setor na Região Nordeste (Bahia - 17,2%, Pernambuco - 13,1% e Ceará - 12,5%), porém, o Rio Grande do Sul é o estado com o maior rebanho (21,5%). A produção anual de lã alcançou 11 milhões de toneladas em 2016, principalmente no Rio Grande do Sul, com cadeia produtiva formada por 35 mil estabelecimentos agropecuários (IBGE, 2016).

O Brasil possui também o maior rebanho de equinos na América Latina e o terceiro mundial. São cerca de 8 milhões de cabeças, somados aos muares (mulas) e asininos (asnos), movimentando R\$ 7,3 bilhões, somente com a produção de cavalos. A maior população brasileira de equinos encontra-se na região Sudeste, seguido da Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Norte (BRASIL, 2017). Nas últimas três décadas, a avicultura brasileira tem apresentado altos índices de crescimento. O país se tornou o terceiro produtor mundial de frango e líder em exportação, chegando a 142 países. A carne de frango tem destaque na região Sul, e os estados do Paraná e Rio Grande do Sul são os principais fornecedores (BRASIL, 2017).

A sanidade animal é uma importante estratégia para qualquer país, principalmente para aqueles que, como o Brasil, são líderes na produção de proteína animal. As pesquisas científicas fazem parte do processo que garante a manutenção e ampliação dos programas de sanidade animal. Doenças causadas por patógenos comensais, como *Escherichia coli*,

atualmente são uma preocupação mundial visto que demandam o uso de antimicrobianos de forma exacerbada em animais de produção. Esta prática vai ao encontro das diretrizes de organizações como Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO).

A bactéria *E. coli* está associada a grandes prejuízos ao agronegócio brasileiro. Está entre os principais agentes causadores de diarreias em animais de produção, principalmente bovinos, suínos, equinos, ovinos e bubalinos, bem como, uma das mais importantes causas de mastite clínica em bovinos leiteiros, além de enfermidades extraintestinais como pneumonias, celulite e septicemia em aves (BARBIERI et al., 2013; RICHARDS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016). A capacidade da *E. coli* causar doença está associada à presença de genes de virulência, que possibilitam a caracterização das cepas em patotipos, estando diretamente associados ao nicho de colonização. Além disso, cepas comensais de *E. coli* também podem adquirir genes de virulência alterando suas características de virulência e patogenicidade (CROXEN & FINLAY, 2010). A resistência aos antimicrobianos é outro fator de extrema importância porque limita a medicação utilizada no tratamento das infecções, além de ser facilmente transmitida aos humanos (CHANTZIARAS et al., 2014).

Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar genotípica e fenotipicamente isolados de *E. coli* provenientes de animais de produção: a partir de casos de mastite clínica em bovinos leiteiros; de bezerros com e sem diarreia; isolados comensais oriundos de fezes de cordeiros e potros; e isolados extraintestinais envolvidos em colisepticemia em frangos para consumo humano.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### *2.1 Escherichia coli*

*E. coli* é um bacilo gram-negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, descrito pela primeira vez em 1885 por Theodor von Escherich. Apresenta ampla distribuição na natureza e uma grande diversidade genética e comportamental. Pertence a microbiota normal do intestino de animais de sangue quente e répteis. Entretanto, a aquisição de uma combinação de genes por elementos genéticos móveis



(transposons, profagos, integrons), associados à virulência, leva determinadas cepas a causarem doenças intestinais e extraintestinais (MATTER, 2011).

A partir dos antígenos de superfície denominados O (somáticos), K (capsulares) e H (flagelares) pode-se classificar *E. coli* em diferentes sorogrupos (determinado somente pelo antígeno O) e sorotipos (determinado pelos antígenos O e H). A classificação em sorotipos é realizada *in vitro*, utilizando antissoros específicos para *E. coli* pela técnica de aglutinação. A classificação sorológica é de extrema utilidade para estudos epidemiológicos e diferenciação de cepas virulentas e avirulentas de *E. coli* (RIBEIRO et al., 2016).

*E. coli* consiste em um dos principais agentes envolvidos em diarreia e mortalidade em animais de produção como bovinos, ovinos, suínos e equinos nas primeiras semanas de vida, além de sérios prejuízos na avicultura e cunicultura. Os animais portadores eliminam a bactéria, que contamina a água, os alimentos e fômites; apresentando-se viável por várias semanas ao abrigo da luz solar direta (FOSTER & SMITH, 2009; RIBEIRO et al., 2016).

## 2.2 PATOTIPOS DE *E. coli*

Entre os patotipos de *E. coli* de maior importância veterinária capazes de causar infecções no trato intestinal, pode citar-se: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) e STEC ou VETEC (*E. coli* shiga toxigênica ou verotoxigênica). Entre os patotipos envolvidos em doenças extraintestinais, chamadas coletivamente de ExPEC, estão a UPEC (*E. coli* uropatogênica) e APEC (*E. coli* patogênica aviária) (FERREIRA & KNÖBL, 2000; KAPER et al., 2004). Mais recentemente tem sido proposto um novo patotipo denominado MPEC (*E. coli* patogênica mamária), associado à mastite bovina (RICHARDS et al., 2015; GOLDSTONE et al., 2016). Cada patotipo tem seu próprio mecanismo característico de interagir com a célula hospedeira em seu benefício, embora, às vezes, tenham como alvo a mesma maquinaria do hospedeiro (MATTER, 2011).

### 2.2.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Esse patotipo foi descrito pela primeira vez em 1945 no Reino Unido como causa de diarreia em crianças. Por décadas, o mecanismo pelo qual EPEC causava diarreias era

desconhecido. A partir de 1979, avanços no entendimento da patogênese de EPEC tornaram esse um dos patótipos mais bem estudados (KAPER et al., 2004).

*E. coli* enteropatogênica (EPEC) é o nome dado ao grupo de bactérias que apresentam a capacidade de causar lesões denominadas *Attaching and Effacing* (A/E). Essa lesão histopatológica ocorre na superfície de células epiteliais intestinais e promove degeneração de enterócitos, com destruição de microvilosidades (KAPER et al., 2004; CROXEN et al., 2013). A habilidade de EPEC causar lesões A/E está relacionada a importantes fatores de virulência presentes em uma ilha de patogenicidade de 35 Kb chamada *Locus Enterocyte Effacement* (LEE) (KAPER et al., 2004).

O LEE codifica fatores de aderência imprescindíveis à EPEC, como a intimina, uma proteína de 94 kDa. Essa adesina, responsável pela aderência às células hospedeiras, é codificada pelo gene *eae*. Esse gene também codifica proteínas de secreção tipo III (TSS3), que são responsáveis pela inserção do receptor para intimina nos enterócitos, o *Tir* (*Translocated intimin receptor*). TSS3 formam uma estrutura semelhante a uma agulha ao serem polimerizadas. O *Tir* auxilia na ligação da bactéria ao enterócito, e sua inserção na célula hospedeira promove um rearranjo dos filamentos de actina do citoesqueleto levando a formação de lesões semelhantes a pedestais (KENNY, 2002; CROXEN et al., 2013). Assim, os enterócitos perdem a capacidade de absorção de nutrientes em virtude da sua degeneração e perda das microvilosidades, além da forte aderência de *E. coli* à superfície das células intestinais (GYLES & FAIRBROTHER, 2010).

A adesão inicial de EPEC à superfície das células epiteliais do intestino é mediada por uma adesina denominada *Bundle-forming pillus* (BFP) (GIRÓN et al., 1991). BFP são pili tipo IV codificadas pelo plasmídeo EAF (*E. coli Adherence Factor*) que promovem a ligação entre bactérias, formando microcolônias compactas tridimensionais. Cepas atípicas de EPEC não apresentam esse plasmídeo, portanto não produzem BFP, resultando em aglomerados de bactérias dispersos (CROXEN et al., 2013).

Em medicina veterinária, EPEC apresenta especial importância em suínos, e está associada a diarreias neonatais e pós-desmame, levando a má absorção de nutrientes em virtude da destruição dos enterócitos, porém é considerada menos severa que outros patótipos nessa espécie (AN et al., 2000; MALIK et al., 2006; FRÖHLICHER et al., 2008). Em

bezerros a sua importância ainda é controversa (FOSTER & SMITH, 2009; KOLENDA et al., 2015).

### **2.2.2 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)**

*E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é uma das causas mais comuns de diarreia em animais de produção. É considerado o principal agente da diarreia neonatal em bezerros, nos primeiros quatro dias de vida, e também em leitões desmamados, gerando elevado prejuízo (FOSTER & SMITH, 2009; KOLENDA et al., 2015).

ETEC é caracterizada pela capacidade de produzir dois tipos de fatores de virulência: adesinas, que promovem adesão e colonização no epitélio intestinal e enterotoxinas, responsáveis pela secreção de fluidos. As adesinas mais bem caracterizadas desse patótipo recebem o nome de fímbrias, denominadas F4 (anteriormente K88), F5 (K99), F6 (987P), F17, F18 e F41, e estão presentes dependendo do hospedeiro afetado. Após colonizar o intestino delgado, ETEC produz duas classes de toxinas: termo-lábil (LT), de alto peso molecular, que pode ser inativada a 60°C por 15 minutos, e termo-estáveis (STs), de baixo peso molecular e resistentes a temperatura de 100°C por 15 minutos (DUBREUIL et al., 2016).

As fímbrias de ETEC servem como estruturas de ancoragem a receptores específicos no hospedeiro. Sua patogênese é proporcionada pela interação fímbria-receptor e é especificamente ligada à colonização do intestino delgado e não ao intestino grosso (EDWARDS & PUENTE, 1998; GAO et al., 2013; LUO et al., 2015). A fímbria F4 é considerada a adesina mais importante associada à diarreia em leitões, com capacidade hemaglutinante, apresenta receptores específicos em neonatos e leitões desmamados. Já F5 e F41 apresentam receptores específicos em diversas espécies como bezerros, leitões, cordeiros e cabritos. Essas duas fímbrias são as mais comumente encontradas em isolados de *E. coli* de bezerros (GYLES & FAIRBROTHER, 2010), sendo que a primeira, assim como F4, também apresenta a capacidade de aglutinar células sanguíneas de mamíferos. As fímbrias F6, F18 e F17 apresentam receptores específicos em células epiteliais intestinais de leitões neonatos, leitões desmamados e bezerros, respectivamente (DEAN, 1990; RIPPINGER et al., 1995; OSWALD et al., 1991). Os genes que codificam as fímbrias de ETEC estão localizados em

plasmídeos em sua maioria, com exceção da fímbria F41. A presença, alteração ou ausência de determinados receptores no muco ou nas microvilosidades intestinais varia com a idade, fato que poderia explicar a colonização intestinal e a diarreia mediada por ETEC dependente da idade (DUBREUIL et al., 2016).

As cepas desse patotipo podem produzir ambas as classes de toxinas (LT e ST) ou apenas uma delas. Os genes que codificam as toxinas de ETEC estão localizados em plasmídeos, portanto a sua produção por cepas de ETEC podem ser variáveis (LASARO et al., 2006; ZHANG et al., 2006). A toxina LT é homóloga à toxina da cólera produzida pelo *Vibrio cholerae*, apresentando elevada imunogenicidade e reação cruzada entre elas. A toxina LT tem como mecanismo de ação o aumento intracelular de Monofosfato cíclico de Adenosina (cAMP) que ativa o CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) resultando em secreção de cloreto (CROXEN et al., 2013). Essa movimentação de íons cloreto atrai água no lúmen do intestino por osmose, causando diarreia (FOSTER & SMITH, 2009).

Já as toxinas STs são pouco imunogênicas e podem ser divididas com base nas suas características bioquímicas em: STa, STb e EAST1. A toxina STa está associada a diarreias neonatais em animais, principalmente leitões, bezerros, cordeiros, galinhas e equinos (DUBREUIL et al., 2016). É uma toxina potente e de ação rápida, que se liga no receptor Guanilato Ciclase C (GC-C) resultando em acúmulo celular de Monofosfato cíclico de Guanosina (cGMP) e ativação do CFTR, gerando acúmulo de líquido no intestino pela secreção de íons cloreto e bicarbonato (AKABAS, 2000; HUG et al., 2003). STb é reconhecida como uma potente toxina envolvida em diarreias de leitões desmamados (WHIPP et al., 1981; ZHANG et al., 2006; SPITZER et al., 2014), mas já detectada em isolados de bovinos, galinhas, cães, gatos e humanos (DUBREUIL, 1997). Apresenta ação rápida e de potência moderada, e estimula a secreção de íons sódio, cloreto e bicarbonato. Em decorrência da ação de STb, os níveis de prostaglandina E2 (PGE2) no lúmen intestinal aumentam tendo efeito no sistema nervoso entérico (FUJII et al., 1995; DUBREUIL, 2012). STb pode atuar em células musculares da serosa ileal, aumentando a motilidade do intestino resultando em contrações (HITOTSUBASHI et al., 1992). A toxina EAST1 é amplamente associada a isolados de suínos e tem similaridade com a toxina STa e o seu mecanismo de ação é semelhante ao dessa toxina (DUBREUIL et al., 2016).

### 2.2.3 *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)

*E. coli* enteroinvasora (EIEC) compartilha características bioquímicas, genéticas e de patogenicidade semelhantes à *Shigella* spp. (LAN et al., 2004). Cepas EIEC são patógenos altamente invasivos em células epiteliais intestinais, sendo mais estudados em humanos. Adaptam-se facilmente a diversas mudanças do meio durante a infecção e sua virulência é determinada por uma série de fatores como cápsula, adesinas, sideróforos e  $\alpha$ -hemolisina, importantes para a sobrevivência das cepas, que são responsáveis por causar colisepticemia (NATARO & KARPER, 1998).

Dentre os fatores de virulência conhecidos pode-se citar TSS3, chaperonas (*IpgA*, *IpgC*, *IpgE* e *Spa15*), reguladores transcricionais (*VirF*, *VirB* e *MxiE*), translocadores (*IpaB*, *IpaC* e *IpaD*) e aproximadamente 25 proteínas efetoras (SCHROEDER & HILBI, 2008). A infecção por EIEC é um processo que inclui múltiplas etapas, que envolve a penetração da barreira epitelial, indução da morte macrofágica, invasão das células epiteliais do intestino, supressão da resposta imune, movimentos intra e intercelulares e modulação da integridade epitelial (CROXEN et al., 2013). O quadro clínico caracteriza-se por diarreia aquosa podendo apresentar muco ou sangue (NATARO & KAPER, 1998).

### 2.2.4 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

*E. coli* enterohemorrágica (EHEC) é um patotipo de grande importância zoonótica, cujos principais reservatórios são os ruminantes domésticos, principalmente bovinos (MAINIL & DAUBE, 2005). A doença em humanos ocorre em virtude do contato direto ou indireto das fezes desses animais. O sorotipo mais conhecido deste grupo é o O157:H7, responsável por surtos em diversas regiões do mundo (RUSCONI et al., 2016).

Os principais fatores de virulência de EHEC também são codificados no LEE. Dessa forma, cepas EHEC também causam lesões do tipo A/E. A toxina STx é considerado o principal fator de virulência de EHEC, responsável por apoptose em células endoteliais. Outros fatores como fímbrias tipo 1, fímbrias P, fímbrias S, Sistema de Secreção tipo III (TSS3), plasmídeo O157 também desempenham importante papel na patogênese de EHEC (SAEEDI et al., 2017).

Em suínos, a infecção por EHEC geralmente ocorre entre cinco e 14 dias após o desmame (STRAW et al., 1999), podendo causar diarreia indiferenciada em bezerros até 3 meses de idade (MAINIL & DAUBE, 2005), além de diarreia comum, colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica em humanos (RAFAELLI et al., 2007).

### **2.2.5 *Escherichia coli* shiga toxigênica ou verotoxigênci (STEC/VETEC)**

*E. coli* shiga toxigênica ou verotoxigênci (STEC ou VTEC) é um patotipo que está relacionado à doença do edema em leitões desmamados. Da mesma maneira que EPEC e EHEC, cepas STEC possuem em seu genoma a ilha de patogenicidade LEE, o que confere relação entre esses patotipos (CROXEN et al., 2013). STEC produz shiga toxinas (STx), e o gene que a codifica é encontrado no genoma de um fago temperado, que dissemina seu material genético em diferentes membros da família Enterobacteriaceae, inclusive diferentes sorotipos de *E. coli* (DOUGAN et al., 2001; TOTH et al., 2003).

Após a colonização do intestino delgado por cepas STEC mediante a ligação à fímbria F18, ocorre a produção de STx que é absorvida e passa para a circulação sistêmica (toxemia). Células endoteliais de pequenos vasos do cérebro, mucosa gastrintestinal, tecido subcutâneo e outros tecidos sofrem apoptose pela inativação da síntese proteica (MAINIL et al. 2005). A lesão nas células endoteliais leva o aparecimento do edema pelo aumento da permeabilidade vascular, ocorrendo sinais nervosos característicos da enfermidade (HENTON & HUNTER, 1994).

### **2.2.6 *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC)**

*E. coli* patogênica aviária (APEC) é um patotipo incluso no grupo das *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPECs) e caracteriza-se por cepas envolvidas em diversas doenças de aves como infecções respiratórias, salpingite em poedeiras, onfalite em embriões, além de celulite em frangos de corte e colisepticemia, sendo essas as mais prevalentes enfermidades associada à APEC e responsáveis por grandes perdas econômicas na indústria avícola (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999; JEFFREY et al., 2002; NAKAZATO et al., 2009).

Assim como outros patótipos que causam doenças extraintestinais, APEC possui uma série de fatores de virulência que são requeridos para tal (MELLATA, 2013). Os genes associados à virulência então em sua maioria localizados em plasmídeos, contribuindo para o genótipo de APEC (DZIVA & STEVENS, 2008). Dentre os fatores de virulência de APEC, incluem-se as adesinas, toxinas, sistemas de aquisição de ferro e de resistência no soro. Adesinas são fatores importantes na colonização e estabelecimento da infecção por *E. coli*. A fimbria tipo I (*fimH*) é considerada a principal adesina entre as cepas de APEC e é associada a colonização do trato respiratório superior (NAKAZATO et al., 2009). Outras adesinas importantes associadas a cepas de APEC são *papC* (*Pilus associated with pyelonephritis*), *mat* (*Meningitis associated and temperature regulated fimbriae*), *iha* (*Iron-regulated-gene-homologue adhesin*), *hra* (*Heat-resistant agglutinin*), *sfa/focCD* (*S/FIC fimbriae*) e *tsh* (*Temperature sensitive hemagglutinin*) (EWERS et al., 2007; BARBIERI et al., 2013).

Os sistemas de aquisição de ferro possibilitam a sobrevivência de APEC em ambientes com baixa disponibilidade de ferro, principalmente no hospedeiro. A bactéria adquire ferro no hospedeiro pela produção de sideróforos que agem como quelantes do ferro (WILLIAMS & GRIFFITHS, 1992). Dentre os sistemas de aquisição de ferro podemos citar: *chuA* (*Heme receptor gene - E. coli haem utilization*), *fyuA* (*Ferric yersinia uptake - yersiniabactin receptor*), *ireA* (*Iron-responsive element*), *iroN* (*Catecholate siderophore receptor*), *irp2* (*Iron repressible protein - yersiniabactin synthesis*), *iucD1* (*Aerobactin synthesis*), *sitD chr.* e *sitD ep.* (*Salmonella iron transport system gene*) (EWERS et al., 2007; DZIVA & STEVENS, 2008; BARBIERI et al., 2013).

Algumas cepas de APEC podem produzir toxinas semelhantes as enterotoxinas LT e ST e as verotoxinas STx (NAKAZATO et al., 2009). A atividade citotóxica de APEC pode ser exercida pela presença de genes como *vat* (*Vacuolating autotransporter toxin*), *sat* (*Secreted autotransporter toxin*), *hlyA* (*Hemolysin A*) e EAST1 (*heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative E. coli*) (EWERS et al., 2007; BARBIERI et al., 2013).

Os sistemas de resistência no soro, compreendem fatores na superfície bacteriana que possibilitam a resistência de APEC ao complemento (LYNNE et al., 2007). Dentre eles o fator *iss* (*Increased serum survival*), *neuC* (*K1 capsular polysaccharide*), *ompA* (*Outer membrane protein*) e *traT* (*Transfer Protein*) podem ser exemplificados (EWERS et al., 2007; BARBIERI et al., 2013). Já as invasinas são fatores de virulência importantes para a invasão

de APEC em diferentes tecidos. Os genes *gimB* (*Genetic island associated with newborn meningitis*), *tia* (*Toxigenic invasion locus in ETEC*) e *ibeA* (*Invasion of brain endothelium*) estão entre os associados a cepas de APEC (EWERS et al., 2007; MATTER et al., 2011).

A relação entre isolados de APEC e isolados de ExPEC de humanos, principalmente *E. coli* uropatogênica (UPEC) e associada a meningite neonatal (NMEC), sugere que algumas cepas de APEC podem apresentar potencial zoonótico (MELLATA, 2013).

### **2.2.7 *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC)**

*E. coli* uropatogênica (UPEC), um outro subgrupo de ExPEC, é um dos principais agentes envolvidos em infecções do trato urinário, principalmente em humanos, afetando também animais de companhia (cães e gatos), tendo sido associada a cistites, nefrites e prostatites (TRAMUTA et al., 2012). Em suínos é responsável por prejuízos na cadeia produtiva associados à infertilidade, redução de peso, mortalidade de leitões e gastos com tratamentos (BRITO et al., 2004).

Muitos fatores de virulência de UPEC são compartilhados por outros patótipos que causam infecções extraintestinais, como é o caso de APEC. Os genes de virulência de UPEC que mais frequentemente são isolados de animais incluem *pap* (*pilus associated with pyelonephritis*), *sfa* (*S fimbriae*), *hly* ( $\alpha$ -hemolisina) e *cnf* (fator necrotizante citotóxico) (YURI et al., 1998).

Os genes *pap* e *sfa* codificam adesinas fimbriais de UPEC que são importantes para adesão e invasão tecidual e contribuem para a evasão do sistema imune do hospedeiro e causam resposta inflamatória grave (JOHNSON et al., 2001). Já *cnf1* e *hlyA* são importantes toxinas produzidas por cepas de UPEC, sendo que a primeira causa dano tecidual e inibição da fagocitose por células polimorfonucleares e a segunda forma poros nas membranas de células eucarióticas, levando principalmente a lise de eritrócitos e liberação de íon ferro, utilizado no metabolismo bacteriano (DAVIS et al., 2005; GARCIA et al., 2013).



### 2.2.8 *Escherichia coli* patogênica mamária (MPEC)

*E. coli* patogênica mamária (MPEC) é um recente patotipo proposto, caracterizado por incluir cepas envolvidas em casos de mastite bovina. Estudos realizados até o momento sugerem que MPEC apresenta um ancestral comensal comum, sendo os isolados desse patotipo classificados em sua maioria ao filo-grupo A, sem a definição de um padrão de genes de virulência associados à infecção (RICHARDS et al., 2015; GOLDSTONE et al., 2016).

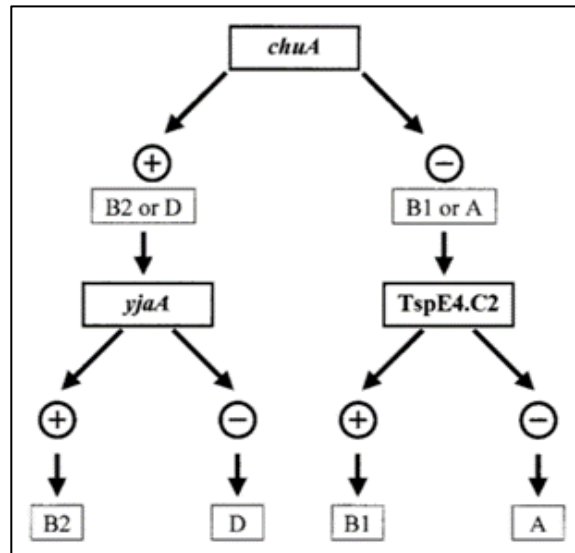
Estudos a nível de genoma de MPEC ainda estão em fase inicial. Dentre os fatores de virulência mais consistentes verificados até o momento incluem o sistema de secreção tipo VI (TSS6) e *lpfA* (*long polar fimbriae*) como conservados em MPEC (DOGAN et al., 2012; RICHARDS et al., 2015).

### 2.3 GRUPOS FILOGENÉTICOS DE *E. coli*

Desde que a composição genética de *E. coli* foi descrita, rapidamente percebeu-se que cepas pertencentes aos diferentes filo-grupos de *E. coli* não foram aleatoriamente distribuídos quanto à sua fonte de isolamento. Significativamente, as cepas responsáveis por infecções extraintestinais eram muito mais propensas a pertencerem aos filo-grupos B2 ou D do que A ou B1 (PICARD et al., 1999; JOHNSON & STELL, 2000). Tal fato passou a ter grande importância clínica, e passou a ser desenvolvido e validado um método de PCR para detecção dos genes *chuA* e *yjaA* e fragmento de DNA denominado TspE4.C2 (GORDON et al., 2008).

O gene *chuA* foi descrito como codificador de proteína transportadora de ferro (*Haem iron-transport system*) em EHEC sorotipo O157:H7 (TORRES & PAYNE, 1997). O gene *yjaA*, inicialmente identificado na sequência do genoma de *E. coli* K-12, tem função ainda desconhecida. E o fragmento de DNA inicialmente desconhecido designado TspE4.C2, posteriormente foi caracterizado como gene codificador da lipase esterase (CLERMONT et al., 2000; GORDON et al., 2008).

A partir desses estudos, Clermont et al. (2000) desenvolveram uma simples e rápida determinação de grupos filogenéticos de *E. coli*. Com base na presença/ausência de *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2. Uma cepa de *E. coli* poderia ser atribuída para um dos principais filo-grupos, A, B1, B2 ou D. A figura 1 representa a árvore de decisão dicotômica empregada na determinação dos filo-grupos de *E. coli* utilizados no estudo.



**Figura 1.** Arvore de decisão dicotômica para determinar o grupo filogenético de uma cepa de *E. coli* pela utilização dos resultados de amplificação pela PCR dos genes *chuA* e *yjaA* e fragmento de DNA TspE4.C2 (Adaptado de CLERMONT et al., 2000).

Desde 2000 tem havido rápida expansão no uso de sequência de multi-locus (MLST) para classificação de *E. coli* recuperados a partir de uma variedade de hospedeiros e habitats. Com os dados de MLST tornou-se possível validar mais eficazmente a utilidade do método de PCR *triplex* para atribuição de filo-grupos (GORDON et al., 2008). Este estudo de validação demonstrou que 80-85% das atribuições de filo-grupos estão corretas. No entanto, também demonstrou que uma fração das cepas foram distribuídas de forma incorreta.

Os extensos conjuntos de dados de MLST disponíveis, e, em menor grau, o crescente número de genomas, também têm melhorado a compreensão da composição genética em *E. coli*. A existência do filo-grupo E, anteriormente um pequeno grupo de cepas das quais O157:H7 é o membro mais conhecido, está agora bem reconhecido (TENAILLON et al., 2010). O filo-grupo F também é documentado e consiste em cepas que formam um grupo irmão ao filo-grupo B2 (JAUREGUY et al., 2008; CLERMONT et al., 2011). Mais recentemente, o filo-grupo C tem sido proposto para um grupo de cepas intimamente relacionadas, porém distintas ao filo-grupo B1 (MOISSENET et al., 2010; CLERMONT et al., 2011). Walk et al. (2009) relataram sobre diversas novas linhagens (novas espécies) do gênero *Escherichia* que são geneticamente distintas, mas fenotipicamente indistinguíveis. Pelo menos uma destas

linhagens ocultas, *Escherichia* clado I, também é considerada um filo-grupo de *E. coli* com base na extensão da recombinação entre cepas detectadas pertencentes ao clado I e *E. coli* (LUO et al., 2011). Portanto, no presente momento, existem oito filo-grupos reconhecidos de *E. coli*, com sete pertencentes a *E. coli sensu stricto* (A, B1, B2, C, D, E, F) e uma correspondente a *Escherichia* clado I (CLERMONT et al., 2013).

Nessa nova análise filogenética de *E. coli*, Clermont et al. (2013) inclui o gene *arpA* que amplifica um fragmento de 400 bp, além dos outros já mencionados (*chuA*, *yjaA* e TspE4.C2), correspondendo a uma PCR *quadruplex*. Paralelamente é realizada PCR para outros genes: *arpA* (específico para o filo-grupo E), *trpA* (específico para o filo-grupo C) que amplificam 301 e 219 bp, respectivamente. A figura 2 representa o esquema de decisão para agrupamento de isolados de *E. coli* em filo-grupos de acordo com Clermont et al. (2013).

Quadruplex genotype				Phylo-group	Next step
<i>arpA</i> (400 bp)	<i>chuA</i> (288 bp)	<i>yjaA</i> (211 bp)	TspE4.C2 (152 bp)		
+	-	-	-	A	
+	-	-	+	B1	
-	+	-	-	F	
-	+	+	-	B2	
-	+	+	+	B2	
-	+	-	+	B2	Could be confirmed by testing <i>ibeA</i> gene <sup>a</sup>
+	-	+	-	A or C	Screen using C-specific primers. If C+ then C, else A
+	+	-	-	D or E	Screen using E-specific primers. If E+ then E, else D
+	+	-	+	D or E	Screen using E-specific primers. If E+ then E, else D
+	+	+	-	E or clade I	Screen using E-specific primers. If E- then clade I, confirm using cryptic clade primers <sup>b</sup>
-	-	+	-	Clade I or II	Confirm using cryptic clade primers <sup>b</sup>
-	(476) <sup>c</sup>	-	-	Clade III, IV or V	Confirm using cryptic clade primers <sup>b</sup>
-	-	-	+	Unknown	Perform MLST
-	-	+	+	Unknown	Perform MLST
+	-	+	+	Unknown	Perform MLST
+	+	+	+	Unknown	Perform MLST
-	-	-	-	Unknown	Confirm <i>Escherichia</i> identification using <i>uidA</i> or <i>gadA/B</i> <sup>a</sup> , if positive screen using cryptic clade primers <sup>b</sup> and/or perform MLST

**Figura 2.** Esquema de decisão para agrupamento de isolados de *E. coli* em filo-grupos de acordo com os resultados da PCR *quadruplex* (Adaptado de CLERMONT et al., 2013).

## 2.4 CURLI E CELULOSE

Curli e celulose são os maiores componentes da matriz extracelular de *E. coli* e estão amplamente associados a aderência a superfícies bióticas e abióticas, favorecendo a colonização no hospedeiro, formando biofilme e auxiliando na sobrevivência em diferentes ambientes (SALDAÑA et al., 2009).

Curli são fímbrias de estrutura proteinácea e representam o principal componente da matriz extracelular de *E. coli*. Pelo menos seis proteínas são necessárias para a formação do curli, e a sua biogênese envolve os operons *csgBA* e *csgDEFG*. Enquanto *csgBA* codifica a subunidade estrutural principal *csgA* e a proteína nuclear *csgB*, *csgDEFG* codifica quatro proteínas acessórias (*csgD*, *csgE*, *csgF* e *csgG*) requeridas para a montagem do curli. As fímbrias de curli estão envolvidas na adesão às superfícies, agregação celular e também na formação de biofilmes. Além disso, o curli participa da adesão celular do hospedeiro e da invasão celular, e também é potente indutor de resposta inflamatória (BARNHART & CHAPMAN, 2006). Ele tem a capacidade de se aderir a diferentes proteínas da matriz celular e do plasma, como fibronectina, laminina, plasminogênio, ativador do plasminogênio e moléculas do complexo maior de histocompatibilidade tipo 1 (OLSEN et al., 1998).

Curli apresenta afinidade pelo corante vermelho congo e diferentes morfotipos podem ser visualizados em placas cultivadas na presença do mesmo. Os quatro morfotipos descritos são: i. rdar (*red, dry, and rough*; expressão de curli e celulose), ii. pdar (*pink, dry, and rough*; somente expressão de celulose), iii. bdar (*brown, dry, and rough*; somente expressão de curli), e iv. saw (*smooth and white*; sem expressão de curli e celulose) (ZOGAJ et al., 2003). A temperatura ambiental é um ponto importante na expressão do curli. As fímbrias de curli são melhor expressas em temperaturas abaixo de 30°C, apesar de alguns isolados de *E. coli* provenientes de amostras clínicas expressarem curli à 37°C (OLSEN et al., 1993; UHLICH et al., 2001).

A celulose é o segundo componente mais importante da matriz extracelular de *E. coli* e seu papel na virulência ainda é pouco investigado. Os genes requeridos para a biossíntese de celulose são codificados pelo operon *bcsABZC*. Entre eles o *bcsA* que codifica a celulose sintase. A função dos outros genes ainda é desconhecida (ZOGAJ et al., 2003). Sua expressão também é favorecida por temperaturas abaixo de 30°C e pode ser mensurada *in vitro* em placas cultivadas contendo o corante calcoflúor. Sob luz ultravioleta pode-se verificar colônias produtoras de celulose emitindo fluorescência (SOLOMON et al., 2005).

#### **2.4.1 Papel do curli e da celulose na formação de biofilmes**

Os biofilmes são geralmente definidos como comunidades bacterianas estruturadas inseridas numa matriz polimérica autoproduzida e aderente a uma superfície inerte ou viva

(SOLOMON et al., 2005). Eles são importantes para a sobrevivência bacteriana em face de pressões ambientais, como dessecação, resistência a antimicrobianos e defesas do hospedeiro (HALL-STOODLEY et al., 2004).

Vários genes são essenciais ou requeridos para a formação de biofilmes. Esses genes incluem aqueles que regulam a expressão de proteínas de adesão a superfícies, acessórios, como fímbrias e pili, e substâncias poliméricas extracelulares (HALL-STOODLEY et al., 2004). Além disso, o ambiente também pode ser influente na sinalização para a diferenciação de biofilmes (DAVIES, 1998).

Dentre os principais fatores envolvidos na formação de biofilme está a expressão de curli e celulose, principais componentes da matriz extracelular de *E. coli* (SALDAÑA et al., 2009). A capacidade de formação de biofilmes está diretamente relacionada à habilidade de formação dessa matriz extracelular (ROMERO et al., 2010; SERRA & HENGGE, 2014). Além de formar uma barreira física resistente ao estresse por cisalhamento e fagocitose, os biofilmes proporcionam o agrupamento de subpopulações bacterianas com características fisiológicas distintas e troca de informações genéticas (HUFNAGEL et al., 2015).

A expressão de fibras extracelulares proteicas de curli e de celulose por *E. coli* agem sinergisticamente e estão envolvidas no contato célula-célula e célula-superfície, gerando o comportamento de comunidade e de colonização do hospedeiro (BARNHART & CHAPMAN, 2006). Esta participação na formação de biofilmes tem como regulador mestre o gene *csgD*. Fatores como temperaturas abaixo de 30°C, tensões de oxigênio, limitações em nutrientes, ausência de sal no meio e alterações de pH podem aumentar a atividade de *csgD*. Já temperaturas elevadas (embora algumas cepas possam expressar curli a 37°C), presença de glicose e alta osmolaridade tendem a inibir o gene (BARNHART & CHAPMAN, 2006; HUFNAGEL et al., 2015).

## 2.5 PLASTICIDADE GENÉTICA E A RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS POR *E. coli*

O genoma de uma espécie bacteriana é classificado em duas categorias: genoma nuclear, que possui genes que estão presentes em todas as cepas de uma espécie bacteriana, como por exemplo os genes de manutenção essenciais envolvidos na replicação, transcrição e tradução, e o genoma “flexível/dispensável” cujos genes estão presentes somente em algumas

cepas ou isolados únicos. Esses genes são responsáveis por diversos fenótipos e adaptações a condições ambientais específicas em uma população ou espécie (MEDINI et al., 2005). Entre os exemplos de genes flexíveis/dispensáveis podemos incluir os elementos móveis como plasmídeos, fagos, ilhas genômicas, entre outros. Em bactérias, esse conjunto genético geralmente codifica fatores de virulência que possibilitam a colonização e capacidade de causar doença (TETTELIN et al., 2005).

*E. coli* apresenta estrutura genômica bastante dinâmica. A aquisição de genes por transferência horizontal e a perda de genes é extensa em *E. coli*, o que resulta em diferentes patótipos com capacidades patogênicas distintas, independente das linhagens filogenéticas. O genoma de *E. coli* é constituído de segmentos de DNA conservados, interrompidos por segmentos dispensáveis introduzidos por recombinações homólogas e inserções de DNA adquiridos horizontalmente (DOBRINDT, 2005).

A disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos também pode ser atribuída à transferência horizontal de genes. Muitos desses genes que conferem resistência a antimicrobianos não são específicos de uma bactéria. Essa transferência horizontal de genes de resistência aos antimicrobianos tem sido atribuída a elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons, já que frequentemente esses genes estão mapeados dentro dessas estruturas (KARCZMARCZYK et al., 2011).

A multirresistência aos antimicrobianos é uma característica que deve ser considerada na patogenicidade de linhagens de *E. coli*. A resistência aos antimicrobianos por linhagens de *E. coli* ocorre também por fenômenos de mutação espontânea e recombinação de genes, resultando em variabilidade genética, na qual atua a seleção dos isolados mais aptos. O uso indevido ou não racional de antimicrobianos no tratamento de afecções em animais, incluindo as causadas por *E. coli*, aumenta a pressão seletiva para as estirpes multirresistentes (CHANTZIARAS et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016).

Isolados de *E. coli* comensais resistentes aos antimicrobianos podem constituir um reservatório significativo de fatores de resistência, podendo propagar-se para bactérias patogênicas de animais e humanos. Por esta razão, a emergência de resistência a antimicrobianos relativamente novos, como é o caso dos  $\beta$ -lactâmicos de espectro estendido e fluoroquinolonas, é particularmente preocupante tanto para a saúde animal quanto para a saúde pública. O potencial de transmissão de clones de *E. coli* entre hospedeiros animais

diferentes e humanos já têm sido documentado, constituindo um fator preocupante quando se trata de saúde coletiva (JOHNSON et al., 2008).

### 3 CAPÍTULO I

#### **Virulence factors and antimicrobial susceptibility profile of extraintestinal *Escherichia coli* isolated from an avian colisepticemia outbreak**

(Artigo Publicado - Microbial Pathogenesis)

Jonas Fernandes Maciel<sup>a</sup>, Letícia Beatriz Matter<sup>a,b</sup>, Michele Martins Trindade<sup>a</sup>, Giovana Camillo<sup>a</sup>, Maristela Lovato<sup>a</sup>, Sônia de Ávila Botton<sup>a</sup>, Agueda Castagna de Vargas<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Prédio 44, Sala 5137, 97105-900, Av. Roraima 1000, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, campus Santo Ângelo, 98802-470, Rua Universidade das Missões, 464, Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, Brazil





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Microbial Pathogenesis



## Virulence factors and antimicrobial susceptibility profile of extraintestinal *Escherichia coli* isolated from an avian colisepticemia outbreak



Jonas Fernandes Maciel <sup>a</sup>, Letícia Beatriz Matter <sup>a,b,\*</sup>, Michele Martins Trindade <sup>a</sup>, Giovana Camillo <sup>a</sup>, Maristela Lovato <sup>a</sup>, Sônia de Ávila Botton <sup>a</sup>, Agueda Castagna de Vargas <sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Prédio 44, Sala 5137, 97105-900, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, campus Santo Ângelo, 98802-470, Rua Universidade das Missões, 464, Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, Brazil

### Article Info

#### Article history:

Received 4 November 2016  
Received in revised form 18 December 2016  
Accepted 19 December 2016  
Available online 21 December 2016

#### Keywords:

Virulence factors  
Antimicrobial susceptibility  
Avian colisepticemia  
*Escherichia coli*

### Abstract

In this study an avian colisepticemia outbreak was investigated. Two isolates from a chicken with colisepticemia were characterized for antimicrobial susceptibility and virulence factors profile. For this purpose 7 antimicrobial and 29 genes (*fimH*, *hlyA/nek*, *iha*, *papC*, *sfa/focCD*, *tsh*, *mat*, *tia*, *gimB*, *ibeA*, *chuA*, *fyuA*, *ireA*, *iroN*, *irp2*, *iucD*, *sitD*, *chr.*, *sitD*, *ep.*, *iss*, *neuC*, *ompA*, *traT*, *astA*, *hlyA*, *sat*, *vat*, *pic*, *malX*, *cvj/cva*) were tested. The outbreak happened in a hick chicken breeding located in the northwestern region of Rio Grande do Sul state in South of Brazil and caused 28.3% (102 dead of a total of 360 chickens) of mortality rate. *Escherichia coli* isolates obtained from the avian spleen and liver belong to the same phylogenetic group A and present resistance to all antimicrobials tested (ampicillin, tetracycline, gentamicin, neomycin, sulfa-trimethoprim, enrofloxacin, and norfloxacin). Both isolates harbor virulence factors related to adhesion (*fimH*, *papC*, *mat*), invasion (*tia*), iron acquisition system (*iroN*) and serum resistance (*iss*, *ompA*, *traT*), showing that these groups are important for Avian Pathogenic *E. coli* (APEC). However, they present different virulence profiles for some genes, whereas liver-isolate carries more *hlyA/nek* (adhesin), *gimB* (invasin), *sitD* *ep.* (iron acquisition system), *sat* (toxin) and *hlyA* (toxin) genes, the spleen-isolate harbors *fyuA* (iron acquisition system) gene. Here, we highlight a coinfection by different strains of APEC in the same animal with colisepticemia, the great antimicrobial resistance of these bacterial isolates and the genetic traits that modulate the virulence for high mortality rate of chickens for human consumption.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

### 1. Introduction

Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) can be responsible for extraintestinal infections [1,2] and depending on the strain's

virulence the local lesions may become systemic and culminating in colisepticemia [3].

A variety of virulence factors have been implicated in extraintestinal colibacillosis in poultry [4]. Adhesins, for example, are essential in the pathogenesis of *E. coli*, since the bacterial binding to host cells represents an important step in the establishment of infections. Iron acquisition systems are important for bacterium growing and surviving in environments with low availability of this metal [5]. Due to this, many extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains acquired a number of iron transport systems, including siderophores, in order to mediate the absorption of iron from the host [6]. Protectins and serum resistance proteins are bacterial surface structures such as LPS, capsule and outer membrane proteins, which promote bacterium protection mainly

\* Corresponding author. Departamento de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, campus Santo Ângelo, 98802-470, Rua Universidade das Missões, 464, Santo Ângelo, Rio Grande do Sul, Brazil.

\*\* Corresponding author. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Prédio 44, sala 5125, 97105-900, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.  
E-mail addresses: [lmatter2006@yahoo.com.br](mailto:lmatter2006@yahoo.com.br) (L.B. Matter), [aguada.vargas@gmail.com](mailto:aguada.vargas@gmail.com) (A. Castagna de Vargas).

regarding the action of the complement system [5].

Through the years, an increased use of antibiotics has been observed in diverse activities, including growth promote, preventive or treatment care. This exaggerated and uncontrolled use of antibiotics, combined with easiness of access, mainly for veterinary practice, has led to the development of resistant bacterial strains [7]. This fact earns great concern, since there is a decline in the number of new antibiotics available for human and animal use [8].

Virulent- and multiple drugs resistant-ExPEC isolates have been reported in the last years [9]. In poultry industry, *E. coli* resistant to more than one drug have been found already for decades [10,11]. This is extremely worrying, since there is a potential zoonotic risk of *E. coli* [12,13].

Strains of *E. coli* investigated in this study were isolated from a colisepticemia outbreak that occurred in a batch of free living chicken for human consumption. This breeding is located in the northwestern region of Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. It was reported a mortality rate of 28.3% (102/360). The strains were isolated from the spleen and liver of a bird belonging to the batch affected, and presented the following clinical signs: prostration, marked pallor and mild diarrhea. The treatment with antibiotics tetracycline; enrofloxacin; and sulfamethoxazole and trimethoprim combination did not show effective results. Therefore, the present study aimed to report the case and to reveal the antimicrobial susceptibility and the virulence factors profiles of *E. coli* isolates from this colisepticemia outbreak.

## 2. Materials and methods

*E. coli* strains SBP 53b/14 and SBP 53f/14 were isolated from the

spleen and liver, respectively, of a 73-days-old chicken with colisepticemia belonging to a batch of free living chicken for human consumption. The outbreak occurred in a herd located in a rural region, Southern Brazil. The chicken necropsy showed hepatomegaly with presence of pale areas, peri-hepatitis with adhesion in the liver cavity, cardiomegaly, splenomegaly, pale and enlarged kidneys, pneumonia, colitis and typhlitis.

The bacterial strains were isolated and identified by using XLD agar, Brilliant Green agar and McConkey agar, followed by application of a set of keys for biochemical identification of bacteria [14].

The antimicrobial susceptibility was conducted using the disc diffusion test according to the Clinical and Laboratory Standards Institute [15] guidelines. The antimicrobial agents tested included: ampicillin (10 µg), tetracycline (30 µg), gentamicin (10 µg), neomycin (30 µg), sulfa-trimethoprim (25 µg), enrofloxacin (5 µg), and norfloxacin (10 µg). All antimicrobial disks were commercially acquired from Laborclin® (Pinhais, PR, Brazil). For neomycin the breakpoints were obtained from Sayah et al. [16].

Bacterial DNA was extracted from the whole organism (micro-organisms cultured overnight in LB agar at 37°C) by the boiling method [17].

Phylogenetic classification of the isolates was performed according Clermont et al. [18]. The presence of 29 genes (*fimH*, *hlyA/hlyE*, *iha*, *papC*, *sfa/focCD*, *tsh*, *mat*, *tia*, *gimB*, *ibeA*, *chuA*, *fyuA*, *ireA*, *iroN*, *irp2*, *iucD*, *sitD chr.*, *sitD ep.*, *iss*, *neuC*, *ompA*, *traT*, *astA*, *hlyA*, *sat*, *vat*, *pic*, *malX*, *cvi/cva*) related to *E. coli*-virulence factors (described in Table 1) was investigated using PCR multiplex as previously described by Ewers et al. [12] and Matter et al. [19], using as positive controls the strains reported in the latter reference.

**Table 1**  
Virulence genes of *E. coli* strains isolated from chicken in a colisepticemia outbreak.

Gene(s)	Gene description	Isolates Organ	
		SBP 53b/14 spleen	SBP 53f/14 liver
<b>Adhesins</b>			
<i>fimH</i>	Type 1 fimbriae	+	+
<i>hlyA/hlyE</i>	Heat-resistant agglutinin	-	+
<i>iha</i>	Iron-regulated-gene-homologue adhesion	-	-
<i>papC</i>	Pilus associated with pyelonephritis	+	+
<i>sfa/focCD</i>	S/FIC fimbriae	-	-
<i>tsh</i>	Temperature sensitive hemagglutinin	-	-
<i>mat</i>	Meningitis associated and temperature regulated fimbriae	+	+
<b>Invasins</b>			
<i>gimB</i>	Genetic island associated with newborn meningitis	-	+
<i>tia</i>	Toxicogenic invasion locus in ETEC	+	+
<i>ibeA</i>	Invasion of brain endothelium	-	-
<b>Iron acquisition</b>			
<i>chuA</i>	Heme receptor gene ( <i>E. coli</i> haem utilization)	-	-
<i>fyuA</i>	Ferric yersinia uptake (yersiniabactin receptor)	+	-
<i>ireA</i>	Iron-responsive element (putative catechol siderophore receptor)	-	-
<i>iroN</i>	Catechol siderophore (salmochelin) receptor	+	+
<i>irp2</i>	Iron repressible protein (yersiniabactin synthesis)	-	-
<i>iucD1</i>	Aerobactin synthesis	-	-
<i>sitD chr.</i>	<i>Salmonella</i> iron transport system gene	-	-
<i>sitD ep.</i>	<i>Salmonella</i> iron transport system gene	-	+
<b>Protectins/Serum resistance</b>			
<i>iss</i>	Increased serum survival	+	+
<i>neuC</i>	K1 capsular polysaccharide	-	-
<i>ompA</i>	Outer membrane protein	+	+
<i>traT</i>	Transfer Protein	+	+
<b>Toxins</b>			
<i>astA</i>	EAST1 (heat stable cytotoxin associated with enteroaggregative <i>E. coli</i> )	+	+
<i>hlyA</i>	Hemolysin A	-	+
<i>sat</i>	Secreted autotransporter toxin	-	+
<i>vat</i>	Vacuolating autotransporter toxin	-	-
<b>Others</b>			
<i>pic</i>	Serin protease autotransporter	-	-
<i>malX</i>	Pathogenicity-associated island marker CFT073	-	-
<i>cvi/cva</i>	ColVplasmid operon	-	-

### 3. Results and discussion

Strains SBP 53b/14 and SBP 53f/14 were isolated from the spleen and liver, respectively, of a chicken that died with colisepticemia. This colisepticemia outbreak with 28.3% of mortality rate happened in a flock of free living chickens which have not been fed with growth promoter.

Both strains had the same antimicrobial susceptibility profile, presenting resistance to ampicillin, tetracycline, gentamicin, neomycin, sulfa + trimethoprim, enrofloxacin and norfloxacin.

The antimicrobials resistance for at least seven drugs widely used in poultry, characterize the strains as multidrug-resistance. This fact warn us about the risk of outbreaks caused by multidrug-resistance strains. According to Moreno et al. [20], commensal *E. coli* can also generate extraintestinal lesions influenced by antimicrobial resistance. According to Gross [10], strains of *E. coli* isolated from birds are often resistant to more than one drug, and the indiscriminate use of antibiotics is the most important factor to promote the selection and dissemination of this resistance [7]. As the antimicrobial therapy is the main way to reduce the morbidity and mortality caused by APEC infection the prudent use of them is important in order to preserve its therapeutic application in animals and humans [21].

The isolates SBP 53b/14 and SBP 53f/14 were classified as belonging to the phylogenetic ECOR A group. According Clermont et al. [18] strains belonging to this group are considered mostly commensal. On the other hand, strains belonging to ECOR B2 and D groups are recognized as being responsible for about two-thirds of all infections caused by ExPEC [9]. Clermont et al. [18] raise the possibility of acquisition of virulence genes by commensal bacteria. In accordance, for Dziva & Stevens [22] virulence genes for adhesins: *fimH* (Type 1 fimbriae) and *tsh* (Temperature sensitive hemagglutinin); protectins: *iss* (Increased serum survival); and the iron acquisition systems genes (iron-scavenging systems) allow intestinal commensal *E. coli* to become APEC, able to infect extra-intestinal sites. Strains isolated in our work carry *fimH*, *iss* and iron-scavenging systems genes (Table 1).

According to Ewers et al. [12], ECOR A was the most prevalent group among isolates of avian extraintestinal infections. These authors working with 436 isolates from colibacillosis, in Europe, have found 46.1% as ECOR A. However, Brazilian avian isolates from cellulite and septicemia were predominantly belonging to groups D and A [17,23].

In relation to the genotype of the both isolates, even belonging to the same phylogenetic ECOR A group, they showed slight difference in the virulence genes profile. Only the isolate from liver presented the agglutinin *hrlA/hek* gene. However, the most important adhesins genes for the extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), *fimH*, *papC* and *matC* were detected in both strains. The same strain also presented *gimB*, genetic island associated with newborn meningitis, which is considered important for invasion process [12,24].

The other difference observed between the two strains involves the genes regarding to the acquisition of iron. In both strains was detected *iroN* gene, however, only the spleen-isolate demonstrated *fyuA* gene, while the liver-isolate presented *sitD ep.*. The presence of a variety of genes related to iron absorption is essential, since this metal contributes to the bacterial metabolism, providing increased survival and infectivity. The bacterial iron acquisition systems enable the acquisition of iron from sources not readily available in the host [6].

Liver-isolate also carries two toxin genes, *sat* and *hlyA*, which triggered tissue damage and inflammation respectively, by uropathogenic *E. coli* in urinary tract infection [25].

The other virulence genes are equally distributed in the two

strains, highlighting the protectin/resistance serum group, three of the four genes searched, are present in both isolates.

Genes investigated in this work are usually found in extra-intestinal pathogenic *E. coli*, which are isolated from avian cellulitis and septicemia, as well as, from animal and human urinary tract infection and human meningitis [12,17,23] and modulate the virulence in these strains. Here we found that liver-isolate presented one adhesin, one invasins and two toxins more than the spleen-isolate.

### 4. Conclusions

The isolation of two strains with different virulence profiles in the same animal characterizes one coinfection of APEC, being both strains multiresistant to the main antimicrobials used in poultry production. In addition, it was shown that avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) belonging to the ECOR A group promoted colisepticemia in a batch of free living chicken for human consumption, generating high mortality rate, what was probably modulated by adhesins, invasins, iron acquisition systems and protectins as virulence factors.

### Acknowledgements

The authors are grateful to Brazilian funding agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul grants no 68.902.901.582.806.000.000 (FAPERGS/CAPES 17/2012) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior grants no 2734/2011 (PNPD) for the financial support. The funding source(s) had no involvement with the work.

### References

- [1] J.S. Jeffrey, L.K. Nolan, K.H. Tonooka, S. Wolfe, C.W. Giddings, S.M. Horne, et al., Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens, *Avian Dis.* 46 (2002) 48e52.
- [2] B.G. Brito, L.C.J. Gaziri, M.C. Vidotto, Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis, *Infect. Immunol.* 71 (2003) 4175e4177.
- [3] F. Horn, A.M.R. Corrêa, N.L. Barbieri, S. Glodde, K.D. Weyrauch, B. Kaspers, et al., Infections with avian pathogenic and fecal *Escherichia coli* strains display similar lung histopathology and macrophage apoptosis, *PLoS One* 7 (2012) e41031.
- [4] C. Ewers, T. Janben, S. Kiebling, H. Phillip, L.H. Wieler, Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated of colisepticemia in poultry, *Vet. Microbiol.* 104 (2004) 91e101.
- [5] G. Nakazato, T.A. Campos, E.G. Stehling, M. Brocchi, W.D. Silveira, Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), *Pesqui. Vet. Bras.* 29 (2009) 479e486.
- [6] A. Garenaux, M. Caza, C.M. Dozois, The ins and outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*, *Vet. Microbiol.* 153 (2011) 89e98.
- [7] G.S. Bbosa, N. Mwebaza, J. Odda, D.B. Kyegombe, M. Ntale, Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance, *Scienc. Res. Publ.* 6 (2014) 410e425.
- [8] A.J. Watkinson, G.R. Micalizzi, J.R. Bates, S.D. Costanzo, Novel method for rapid assessment of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from environmental waters by use of a modified chromogenic agar, *App Environ. Microbiol.* 73 (2007) 2224e2229.
- [9] C. Ewers, A. Bethe, I. Stamm, M. Grobbel, P.A. Kopp, B. Guerra, et al., CTX-M-15-D-ST648 *Escherichia coli* from companion animals and horses: another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence? *J. Antimicrob. Chemother.* 69 (2014) 1224e1230.
- [10] W.B. Gross, Colibacillosis, in: M.S. Hofstad, B.W. Calneck, C.F. Helmbod, W.M. Reid, H.W. Yoder (Eds.), *Disease of Poultry*, Iowa State University Press, Ames, 1991.
- [11] A.J.P. Ferreira, T. Knöbl, Colibacilose aviária, in: A. Berchieri Júnior, M. Macari (Eds.), *Doenças das Aves*, FACTA, Campinas, 2000.
- [12] C. Ewers, G. Li, H. Wilking, S. Kiebling, K. Alt, E. Antão, et al., Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* 297 (2007) 163e176.
- [13] T.J. Johnson, Y. Wannemuehler, S.J. Johnson, A.L. Stell, C. Doetkott, J.R. Johnson, et al., Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic

- pathogens, *App Environ. Microbiol.* 74 (2008) 7043e7050.
- [14] J.F. Macfaddin, *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, third ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2000.
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute, *Performance Standards for Anti-microbial Disk and Dilution Susceptibility Testing for Bacteria Isolated from Animals: Second Informational Supplement VET01-S2*, CLSI, Wayne, PA, USA, 2013.
- [16] R.S. Sayah, J.B. Kaneene, Y. Johnson, R. Miller, Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water, *App Environ. Microbiol.* 71 (2005) 1394e1404.
- [17] N.L. Barbieri, A.L. Oliveira, T.M. Tejkowski, D.B. Pavanelo, D.A. Rocha, L.B. Matter, et al., Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence, *PLoS One* 8 (2013) e72322.
- [18] O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 4555e4558.
- [19] L.B. Matter, N.L. Barbieri, M. Nordhoff, C. Ewers, F. Horn, Avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken fibroblasts, *Vet. Microbiol.* 148 (2011) 51e59.
- [20] E. Moreno, G. Prats, I. Planells, A.M. Planes, T. Pérez, A. Andreu, Characterization of *Escherichia coli* isolates derived from phylogenetic groups A and B1 causing extraintestinal infection, *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 24 (2006) 483e489.
- [21] C. Gyles, Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry, *Anim. Health Res. Rev.* 9 (2008) 149e158.
- [22] F. Dziva, M.P. Stevens, Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts, *Avian Pathol.* 37 (2008) 355e366.
- [23] N.L. Barbieri, A.L. Oliveira, T.M. Tejkowski, D.B. Pavanelo, L.B. Matter, S.R.S. Pinheiro, et al., Molecular characterization and clonal Relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with colisepticemia, *Foodborne Pathog. Dis.* 12 (2015) 74e83.
- [24] L.B. Matter, D.A. Spricigo, C. Tasca, Vargas, AC de. Invasin *gimB* found in a bovine intestinal *Escherichia coli* with an adherent and invasive profile, *Braz J. Microbiol.* 46 (2015) 875e878.
- [25] M.A. Croxen, B.B. Finlay, Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity, *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (2010) 26e38.

## 4 CAPÍTULO II

### **Phylo-typing and in vitro antimicrobial susceptibility testing of clones derived from *Escherichia coli* isolated from feces of non-diarrheic foals and lambs**

Jonas Fernandes Maciel<sup>a</sup>, Agueda Castagna de Vargas<sup>a\*</sup>

(Artigo a ser submetido para publicação)

<sup>a</sup>Setor de bacteriologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 97105-900.

\*Corresponding author: Tel.: +55 55 3220 8107; fone/fax: +55 3220 8257. Email address: agueda.vargas@gmail.com.

**Phylo-typing and in vitro antimicrobial susceptibility testing of clones derived from  
*Escherichia coli* isolated from feces of non-diarrheic foals and lambs**

**Abstract**

Microbiological culture is still a widely used tool for the diagnosis of animal and human bacteria. In this method, isolated colonies or a group of them are evaluated. The objective of this study was to determine the phylogenetic and antimicrobial susceptibility profile of *Escherichia coli* clones obtained from faeces samples from non-diarrheic foals and lambs without any previous antimicrobial treatment. Samples were cultured and subsequent phylogenetic clustered and in vitro susceptibility profiles of five colonies isolated from *E. coli* from the same sample were evaluated. The results showed that there are differences between colonies isolated from the same sample, both phylogenetically and susceptibility profiles (independent of phylogenetic classification). Therefore, the use of only one colony for phenotype and molecular methods may not be representative of the pathogenicity of strains in each sample.

Key words: antibiotic resistance, commensal *Escherichia coli*, foal, lamb, phylogroup

**1. Introduction**

*Escherichia coli* is a commensal bacterium of the gastrointestinal tract of mammals that may actively participate in the emergence of virulence factors and antibiotic resistance (TENNAILON et al., 2010). The phylo-typing of *E. coli* strains isolated from several animal species, including humans, has been largely employed to estimate their pathogenic potential and distribution in nature. The amplification of *arpA*, *chuA*, *yjaA* genes and DNA fragment TspE4.C2 allows the *E. coli* classification into seven phylogenetic groups (A, B1, B2, C, D, E, F) and *Escherichia* clade I (CLERMONT et al., 2013). The strains classified into the phylogroups A/B1/C are considered commensal, while those classified into B2/D/F and E are considered pathogenic extra-intestinal and enteropathogenic, respectively. *Escherichia* clade I resulted from extent recombination between *E. coli* strains, and the members of this phylogroup have no well-defined pathogenic potential (WALK et al., 2009; CLERMONT et al., 2011; LUO et al., 2011).

Sheep have been implicated as an important reservoir of STEC (shiga toxin-producing *E. coli*), particularly O157 serogroup (BRANDAL et al., 2012), which are better adapted to their alimentary tract than are other pathotypes of *E. coli* (CORNICKE et al., 2000), persisting in the rumen and colon and being shed through feces. For these reasons, several hygienic

treatments and procedures are often applied to avoid or minimize sheep carcass contamination with *E. coli*. Conversely, the role of horses as reservoirs of pathogenic *E. coli*, more specifically foals, has received minor attention. Besides the close relation of horses and humans, its breeding for meat production for consumption has increased, especially in European Community Countries (MARTUZZI et al., 2001). As such, the purpose of monitoring the emergence of the main human *E. coli* phylogroups and the appearance of antibiotic resistance in commensal *E. coli* isolated from horses is essential.

The rapid emerging and spread of antibiotic resistance among commensal and pathogenic organisms and the delayed development and use of new antibiotics has been a big challenge to control infectious bacterial diseases in this century. *E. coli* is a highly adaptable pathogen for many reasons, as the presence of several mobile elements related to antimicrobial resistance, the facilitated exchange of genetic material with other *Enterobacteriaceae*, and the enormous diversity of hosts and their coexistence in nature (KAPER et al., 2004; KHACHATRYAN et al., 2006; TENAILLON et al., 2010; KARZMARCZYK et al., 2011; CHANTZIARAS et al., 2014).

To wholly understand the virulence and antibiotic resistance of pathogenic *E. coli* strains it is firstly necessary to learn about the commensal *E. coli* behavior (TENAILLON et al., 2010). To achieve that, the present study was undertaken with the objectives as following: (i) to isolate and phylo-type *E. coli* strains from feces of non-diarrheic foals and lambs using a quadruplex PCR recently described, (ii) to determine the occurrence of phylogenetic diversity of clones derived from the *E. coli* strains, and (iii) to determine the in vitro antimicrobial susceptibility of *E. coli* strains, and their clones, against 12 drugs by disk-diffusion method.

## **2. Material and methods**

### **2.1 *E. coli* isolates and clones selection**

Fecal samples were collected directly from the rectal ampule of 13 non-diarrheic Thoroughbred foals with 3 to 5-weeks age from September to November 2015 in two farms located in Bagé, Rio Grande do Sul (RS), Brazil. Feces were also collected from 13 non-diarrheic mixed breed lambs with 2 to 3-months age from November to December 2016 in two farms located in the Central region of the RS state. All animals were physically examined to ensure that they were healthy. Both foals and lambs had never been treated with antimicrobials previously; however, those were widely used in the farms. Samples in both species occurred for convenience.

An aliquot of 1g of each fecal sample was dissolved in 9 ml of sterile 0.9% saline solution. Approximately 50  $\mu$ L were plated in four quadrant streaks for bacterium isolation in MacConkey Agar and incubated in aerobiosis for 24h at 37 °C. Five colonies were selected for isolation and identification of *E. coli* strains according to the bacterial identification keys by biochemical series available in MACFADDIN (2000). Following, the strains were kept in freezing media at -20°C until use.

## 2.2 Phylogenetic analysis

The DNA were extracted by boiling method from five clones, randomly picked, of each *E. coli* strain (n=26; 13 from foals and 13 from lambs), totalizing 130 DNA samples that were analyzed regarding their quantity, quality, and purity. A quadruplex PCR was performed by the amplification of *arpA*, *chuA*, *yjaA* genes and DNA fragment TspE4.C2 according to the methodology described by Clermont et al. (2013). All clones from the 26 strains were classified into the phylogenetic groups A, B1, B2, C, D, E, F and clado I, proposed by Clermont et al. (2013). Following the phylogenetic classification, we calculated a Diversity Index (DI) for all strains by dividing the number of phylogroups found in each strain by the number of clones evaluated (n=5).

## 2.3 Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility tests were performed by disc-diffusion technique in accordance with the guidelines of the Clinical Institute and Laboratory of Standards (CLSI, 2013). We tested 5 clones from 10 *E. coli* strains (5 from foals and 5 from lambs), totalizing 50 assays. The strains chosen were those with clones classified in different phylogroups. The antimicrobials (Laborclin®, Pinhais, PR, Brazil) tested were:  $\beta$ -Lactams - ampicillin (AMP, 10  $\mu$ g), penicillin (PEN, 10 U), ceftiofur (XNL, 30  $\mu$ g) and ceftriaxone (CRO, 30  $\mu$ g); Aminoglycosides - gentamicin (GM, 10  $\mu$ g); Macrolides - erythromycin (ERY, 15  $\mu$ g); Quinolones - enrofloxacin (ENO, 5  $\mu$ g) and ciprofloxacin (CIP, 5  $\mu$ g); Tetracyclines - tetracycline (TET, 30  $\mu$ g); Sulfonamides - sulfonamide (SUL, 300  $\mu$ g) and trimethoprim-sulfamethoxazole (STX, 25  $\mu$ g); Phenicol - florfenicol (FFC, 30  $\mu$ g). *E. coli* ATCC 25922 was used as the reference strains for quality control of all assays. The strains and their respective clones were classified as sensitive (S), resistant (R), and moderately sensitive (MS) to each antimicrobial tested. We calculated the antibiotic resistance score as  $(R/nA) \times 100$ , where n is the number of strains tested, A is the number of antibiotics tested and R is the summation of the number of strains R to each antimicrobial tested (SKURNIK et al., 2006).



### 3. Results

#### 3.1 Phylogenetic classification

From the 13 *E. coli* strains isolated from foals, 9 (69.23%) showed phylogenetic variability among their clones, and 4 (30.77%) did not (Table 1). The average DI observed was 0.38; ranging from 0.2 (all clones from the same phylogroup) to 0.8 (clones from 3 phylogenetic groups and an unknown group). Considering the strains, 6 (46.15%) presented all clones classified in commensal phylogroups of *E. coli* (including those classified as “Unknown”), and 7 (53.85%) presented at least one classified in pathogenic phylogroups. Considering the clones, we found B1 (50.77%), E (21.54%), C (15.38%), unknown (6.15%), A (4.62%), and F (1.54%). The phylogroups A, B1 and C represented 70.77% of the clones, while the virulent phylogroups (E and F) represented 23.08%. There was coexistence of pathogenic and commensal phylogroups in 46.15% of the strains evaluated (6/13).

From the 13 *E. coli* strains isolated from lambs, 2 (15.38%) showed phylogenetic variability among their clones, and 11 (84.62%) did not (Table 1). The average DI observed was 0.21; ranging from 0.2 (all clones from the same phylogenetic group) to 0.4 (clones from 2 phylogenetic groups). Considering the strains, 12 (92.30%) presented all clones classified in commensal groups of *E. coli*, and 1 (7.70%) presented at least one classified into pathogenic group. Approximately 77% were classified into B1 phylo-group. None of them was classified as “unknown”. Considering the clones, we found B1 (81.54%), C (10.77%), A (6.15%), and E (1.54%). The phylogenetic groups A, B1 and C represented 98.46% of the clones, while the group related to virulent *E. coli* (E) represented 1.54%. There was coexistence of pathogenic and commensal group in 7.70% of the strains (1/13).

#### 3.2 Antimicrobial susceptibility profile

In Table 2 and 3 shows the antimicrobial susceptibility profile of 10 *E. coli* strains (5 from foals and 5 from lambs), and their respective clones, against 12 antimicrobials from 8 classes. All strains from foals' samples were completely sensitive to XNL, CRO, GM, ENO, and CIP (Table 2, grey scale); 4 and 3 strains were completely sensitive to STX and SUL, respectively. In the other hand, 4 strains were partially resistant to ERY and TET, 3 strains were partially resistant to FFC and AMP, and all strains and their clones were resistant to PEN. We also observed clones with different antimicrobial susceptibility profile, regardless their phylogroup, in all strains evaluated. The antibiotic resistance score for *E. coli* isolated from foals' feces were 18.33.

Concerning the *E. coli* strains isolated from lambs, 100% were completely sensitive to XNL, CRO, GM, CIP, SUL, FFC, and STX (Table 3, grey scale); 4 and 3 strains were completely sensitive to ENO and TET, respectively. Conversely, none strain were sensitive to PEN and ERY. Although only two clones from the strain number “12” showed resistance to AMP, none strain was totally sensitive to it; we observed several clones being MS. All strains isolated from lambs showed clones displaying different antimicrobial susceptibility profile against at least one antimicrobial tested, regardless their phylogroup. The antibiotic resistance score for *E. coli* isolated from lambs’ feces were 16.

#### 4. Discussion

The *E. coli* phylo-typing has been largely used to classify isolates as commensal and pathogenic; however, *E. coli* strains from non-diarrheic foals and lambs are scarcely covered by the recently updates in this approach. In the present study, the quadruplex PCR used allowed us to classify the 26 *E. coli* strains in 6 phylogroups, however, 4 clones derived from different strains were not phylo-typed, and were classified into an “unknown” phylogroup (Table 1). Sixty-nine percent (9/13) and 15.32% (2/13) of *E. coli* strains from foals and lambs showed phylogenetic variability, respectively. We found average 0.38 DI in foals’ strains, while the lambs’ DI average was 0.21. Four phylogroups were observed in the lambs’ isolates, against 6 observed in foals’ isolates. It is well known that a single host can harbor multiple *E. coli* strains, and that this phenomenon is associated to the hosts’ domestication (SMATI et al., 2015).

Sixty nine percent of the strains isolated from feces of non-diarrheic foals had at least one clone belonging to B1 phylogroup, and two strains (15%) showed all clones classified into it. The second most prevalent phylogroup in these samples was E, once 46% of the *E. coli* presented at least one clone belonging to it. The predominance of B1 phylogroup was observed previously in healthy-young horses; in the same study, the absence of E phylogroup was verified (SMATI et al., 2015). Although we observed a higher prevalence of B1 phylogroup, our find about strains belonging to phylogroup E should receive special attention because the potential risk to public health. The high virulent and pathogenic O157:H7 *E. coli* belongs to this latter phylogroup (TENAILLON et al., 2010).

In the present study, the phylo-typing of *E. coli* from lambs samples was almost restricted to the B1 phylogroup (77%, 10/13 strains). The remaining strains (n=3) presented clones classified exclusively into C, C/B1, and A/E phylogroups. Carlos et al. (2010) analyzed 29 *E. coli* strains, isolated from feces of apparently healthy sheep, and found 68.97%

classified as B1, 13.8% into A, and 17.24% into D phylo-groups. Martins et al. (2016) analyzed 25 atypical *E. coli* strains (AEPEC), isolated from feces of healthy lambs, and found 72% into B1, 20% into A, and 4% into group D and B2. Although none of the *E. coli* strains isolated here was classified into phylogroup D, the high prevalence of B1 seems to be characteristic of strains isolated from lambs in Brazil. Derakhshandeh et al. (2015) found a quite different profile in *E. coli* strains isolated from feces of herbivorous from Iran, where 41.2% of them were classified into phylogroup D, and 29.4% into A and B2. The high prevalence of phylogroup B1 in herbivorous mammals and the geographic effects in the *E. coli* phylogroups among hosts has been supported and well documented (CARLOS et al., 2010).

The predominance of *E. coli* classified into B1 has been reported in others apparently healthy hosts. Bessalah et al. (2016) isolated *E. coli* from feces of young camel and found 52.9% belonging to the B1 phylogroup, followed by A (17.6%) and F (11.7%), while Coura et al. (2016) analyzed *E. coli* isolated from calf feces and observed 68% into B1, followed by E phylogroup (16.96%). The predominance of *E. coli* belonging to B1 group in apparently healthy hosts was also verified in samples from adult buffaloes (63.4%) (COURA et al., 2015) and adult pigs (60%) (GIRARDINI et al., 2012). Along with these reports, we come to an agreement about the commensal classification of *E. coli* into B1 phylo-typing.

We verified a high variability in the antimicrobial susceptibility of *E. coli* strains from foals' feces, including the clones analyzed, regardless the phylogroup found. Holland et al. (1996) also analyzed the susceptibility profile of *E. coli* isolated from foals and did not find any association with a particular *E. coli* serotype or biotype, as observed herein. Although the foals sampled in the present study had not been under antimicrobial treatment, the use of antimicrobials, including those for chemoprophylaxis, is largely employed in the farms where the foals were from. The antimicrobials most commonly used were penicillin-streptomycin, GM, STX and XNL (veterinarians' personal information). Here, none *E. coli* from foals were resistant to GM, STX and XNL. Conversely, we described a high level of resistance against ERY (Table 2). Macrolides, in which ERY is included, are also very used to treat *Rhodococcus equi* foal pneumonia (MUSCATELLO, 2012) that was reported as endemic in those farms. The *E. coli* resistance against ERY was formerly associated to antibiotic inactivation by an ERY esterase, which is codified in a self-transferable plasmid (ANDREMONT et al., 1986). Based on our findings, the *E. coli* resistance against ERY is present in the herd evaluated, and may represent a concern in the treatment of *Enterobacteriaceae* infections in general. In humans, *E. coli* is an important reservoir for

macrolide resistance genes potentially transferred to *Shigella* and *Salmonella* spp (NGUYEN et al., 2009).

Induced resistance against STX and ERY, commonly used in the farms in general, was demonstrated in foals' hospitalized without the administration of antimicrobials, while XNL and GM remained efficient against the *E. coli* strains (BRYAN et al., 2010). Other study also evaluated the antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolated from hospitalized and non-hospitalized horses and found 34.8% of resistance against TET, 10.6% against CIP, and 3.4% against FFC (AHMAD et al., 2010). From the antimicrobials evaluated previously (AHMAD et al., 2010) we observed resistance only against TET (36%), which deserves attention once the *E. coli* strains were isolated from healthy horses without previous antimicrobial treatment. Finally, the 100% of resistance observed against PEN was not unexpected. This drug displays greater gram-positive activity instead gram-negative; the synthesis of  $\beta$ -lactamases, such as penicillinases, and PEN reduced permeability due the outer membrane of gram-negative bacteria are well documented forms of resistance (SYKES & MATTHEW, 1976; ZIMMERMANN & ROSSELET, 1977).

In Table 3 we presented the antimicrobial susceptibility of *E. coli* strains isolated from lambs. Although 100% strains were resistant against PEN and ERY (including those MS), we observed an overall sensitivity profile of *E. coli* from lambs, with 100% of sensitivity against XNL, CRO, GM, CIP, SUL, FFC, and STX (Table 3, grey scale). Likewise here, Saei et al. (2012) observed 100% of resistance against PEN and ERY, and a low rate against TET (8.3%) and GM (6.25%) in adult sheep. Conversely, other study reported 40% of resistance against TET in *E. coli* isolated from lambs and goats, however, they had diarrhea (TURKYILMAZ et al., 2013). While we observed only two clones from the same strain showing resistance against AMP, Chaztopoulos et al. (2016) reported 43.5% in *E. coli* isolated from lambs. The monitoring of PEN and AMP resistance in *E. coli* is important to establish the level of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics, which have been commonly used in both veterinary and human medicine for decades (STEDT et al., 2014).

The antibiotic resistance score for *E. coli* isolated from lambs and foals' feces were 16 and 18.33, respectively. These findings are alarming once the antibiotic resistance score for *E. coli* isolated from domestic animals is 11, and for humans is 18 (TENAILLON et al., 2010). We highlight the necessity of further studies to determine the impact of this level of resistance in the risk of commensal *E. coli* as a potential source of infections unresponsive to treatment in both animals and humans.

According to the guidelines of the CLSI (2013), the agar diffusion test should be done using 4 to 5 isolated colonies with the same morphological characteristics from a bacterium. To demonstrate the importance of this recommendation, we analyzed the antimicrobial susceptibility of 5 clones from 10 strains (5 from foals and 5 from lambs) against 12 drugs. All strains from foals and lambs presented clones with variable antimicrobial susceptibility profile against at least one drug tested. Our results reinforce that misclassification issues may occur if those recommendations were left out. Furthermore, the strains tested here were isolated from healthy hosts, which tend to be less diverse than those from diseased hosts. Thus, we believe that strains isolated from diseased hosts may show even larger number of *E. coli* clones with variable antimicrobial susceptibility profile.

## **5. Conclusion**

This study reinforces the high occurrence of non-clinical *E. coli* strains belonging to the commensal phylogroup B1, and the occurrence of diverse phylogenetic classification and susceptibility profile in *E. coli* clones derived from single fecal samples of healthy foals and lambs. Since the strains analyzed here were isolated from young-healthy animals without previous antimicrobial treatment, the lack of antimicrobial sensitivity observed against certain antimicrobials is alarming. Indeed, the selective pressures in the habitats of commensal strains may coincidentally promote the emergence of virulence factors and antibiotic resistance, rendering commensal *E. coli* strains reservoirs of virulent and resistant strains. As recommended by the CLSI, the selection of at least 4 to 5 colonies to perform susceptibility tests should be done to avoid the selection of specific clones that could mischaracterize the strain tested.

## **Acknowledgements**

The authors thank the Brazilian funding agencies: Foundation for Research Support of the State of Rio Grande do Sul process number 68,902,901,582,806,000,000 (FAPERGS/CAPES 17/2012) and Coordination of Improvement of Higher Level Personnel allowance process number 2734/2011 (PNPD) for financial support. The funding sources were not involved in the work.

## **Conflict of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest.

## References

- AHMED, M. O.; CLEGG, P. D.; WILLIAMS, N. J.; BAPTISTE, K. E.; BENNETT, M. Antimicrobial resistance in equine faecal *Escherichia coli* isolates from North West England. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, 9(1):12, 2010.
- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, 128(6):1037-1050, 2007.
- ANDREMONT, A.; GERBAUD, G.; COURVALIN, P. Plasmid-Mediated High-Level Resistance to Erythromycin in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 29(3):515-518, 1986.
- BARBIERI, N. L.; OLIVEIRA, A. L.; TEJKOWSKI, T. M.; PAVANELO, D. B.; ROCHA, D. A.; MATTER, L. B. CALLEGARI-JACQUES, S. M.; BRITO, B. G.; HORN, F. Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. **Plos One**, 8:e72322, 2013.
- BESSALAH, S.; FAIRBROTHER, J. M.; SALHI, I.; VANIER, G.; KHORCHANI, T.; SEDDIK, M. M.; HAMMADI, M. Antimicrobial resistance and molecular characterization of virulence genes, phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy camel-calves in Tunisia. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 49:1-7, 2016.
- BRANDAL, L. T.; SEKSE, C.; LINDSTEDT, B. A.; SUNDE, M.; LØBERSLI, I.; URDAHL, A. M.; KAPPERUD, G. Norwegian Sheep Are an Important Reservoir for Human-Pathogenic *Escherichia coli* O26:H11. **Applied and Environmental Microbiology**, 78(12):4083-4091, 2012.
- BRYAN, J.; LEONARD, N.; FANNING, S.; KATZ, L.; DUGGAN, V. Antimicrobial resistance in commensal faecal *Escherichia coli* of hospitalised horses. **Irish veterinary journal**, 63(6):373-379, 2010.
- CARLOS, C.; PIRES, M. M.; STOPPE, N. C.; HACHICH, E. M.; SATO, M. I. Z.; GOMES, T. A. T.; AMARAL, L. A.; OTTOBONI, L. M. M. *Escherichia coli* phylogenetic

group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. **BMC Microbiology**, 10:161, 2010.

CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B.; DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 69:827-834, 2014.

CISEK, A. A. RZEWUSKA, M., WITKOWSKI, L., BINEK, M. Antimicrobial resistance in *Rhodococcus equi*. **Acta Biochimica Polonica**, 61(4):633–638, 2014.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, 66(10):4555-4558, 2000.

CLERMONT, O.; OLIER, M.; HOEDE, C.; DIANCOURT, L.; BRISSE, S.; KEROUDEAN, M.; GLODT, J.; PICARD, B.; OSWALD, E.; DENAMUR, E. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, Genetics and Evolution**, 11:654–662, 2011.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, 5(1):58-65, 2013.

CLERMONT, O.; GORDON, D.; DENAMUR, E. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology (United Kingdom)**, 161:980-988, 2015.

CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard**. 4.ed. Wayne, Pennsylvania, USA, 2013. (CLSI document VET01-A4).

CORNICK, N. A.; BOOHER, S. L.; CASEY, T. A.; MOON, H. W. Persistent Colonization of Sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and Other *E. coli* Pathotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, 66(11):4926-4934, 2000.

COURA, F. M.; DINIZ, S. A.; SILVA, M. X.; MUSSI, J. M. S.; BARBOSA, S. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Phylogenetic Group Determination of *Escherichia coli* Isolated from Animals Samples. **The Scientific World Journal**, ID258424, 2015.

COURA, F. M.; de ARAÚJO DINIZ, S.; MUSSI, J. M.; SILVA, M. X.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. **Folia Microbiologica**, 1-6, 2016.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, 8:26-38, 2010.

DERAKHSHANDEH, A.; FIROUZI, R.; NAZIRI, Z. Phylogenetic group determination of faecal *Escherichia coli* and comparative analysis among different hosts. **Iranian Journal of Veterinary Research**, 15(1):13-17, 2014.

FERENS, W. A.; HOVDE, C. J. *Escherichia coli* O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection. **Foodborne Pathogens and Disease**. 8(4): 465-487, 2011.

GIRARDINI, L. K.; SIQUEIRA, F. M.; KREWER, C. C.; KREWER, C. C.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. Phylogenetic and pathotype analysis of *Escherichia coli* swine isolates from Southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(5):374-378, 2012.

HOLLAND, R. E.; SCHMIDT, A.; SRIRANGANATHAN, N.; GRIMES, S. D.; WILSON, R. A.; BROWN, C. M.; WALKER, R. D. Characterization of *Escherichia coli* isolated from foals. **Veterinary Microbiology**, 48(3-4):243-255, 1996.

ISHII, S.; MEYER, K. P.; SADOWSKY, M. J. Relationship between Phylogenetic Groups, Genotypic Clusters, and Virulence Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains from Diverse



Human and Animal Sources. **Applied and Environmental Microbiology**, 73(18):5703-5710, 2007.

KANG, H. Y.; JEONG, Y. S.; OH, J. Y.; TAE, S. H.; CHOI, C. H.; MOON, D. C.; LEE, W. K.; LEE, Y. C.; SEOL, S. Y.; CHO, D. T.; LEE, J. C. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 55(5):639-644, 2005.

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

KARCZMARCZYK, M. et al. Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Animals Presenting at a University Veterinary Hospital. **Applied and Environmental Microbiology**, 77(20):7104-7112, 2011.

KHACHATRYAN, A. R.; BESSER, T. E.; HANCOCK, D. D.; CALL, D. R. Use of a Nonmedicated Dietary Supplement Correlates with Increased Prevalence of Streptomycin-Sulfa-Tetracycline-Resistant *Escherichia coli* on a Dairy Farm. **Applied and Environmental Microbiology**, 72(7):4583-4588, 2006.

LUO, C.; WALK, S. T.; GORDON, D. M.; FELDGARDEN, M.; TIEDJE, J. M.; KONSTANTINIDIS, K. T. Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108:7200-7205, 2011.

MARTINS, F. H.; GUTH, B. E. C.; PIAZZA, R. M. F.; ELIAS, W. P.; LEÃO, S. C.; MARZOA, J.; DAHBI, G.; MORA, A.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; PELAYO, J. S. Lambs are an important source of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, 196:72:77, 2016.

MARTUZZI, F.; CATALANO, A. L.; SUSSI, C. Characteristics of horse meat consumption and production in Italy. **Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria**, 21:213-233, 2001.

MORLEY, P. S.; APLEY, M. D.; BESSER, T. E.; BURNEY, D. P.; FEDORKA-CRAY, P. J.; PAPICH, M. G.; TRAUB-DARGATZ, J. L.; WEESE, J. S. Antimicrobial drug use in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 19:617-629, 2005.

MUSCATELLO, G. *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal – Part 2: Diagnostics, treatment and disease management. **The Veterinary Journal**, 192(1): 27-33, 2012.

NGUYEN, M. C., WOERTHER, P., BOUVET, M., ANDREMONT, A., LECLERCQ, R., & CANU, A. *Escherichia coli* as reservoir for macrolide resistance genes. **Emerging Infectious Diseases**, 15(10), 1648-1650, 2009.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 53(1):28-52, 2004.

RYALL, B.; EYDALLIN, G.; FERENCI, T. Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, 76(3):597-625, 2012.

SAEI, H. D.; AHMADI, E.; KAZEMNIA, A.; AHMADINIA, M. Molecular identification and antibiotic susceptibility patterns of *Escherichia coli* isolates from sheep faeces samples. **Comparative Clinical Pathology**, 21:467–473, 2012.

SAENZ, Y.; BRIÑAS, L.; DOMÍNGUEZ, E.; RUIZ, J.; ZARAZAGA, M.; VILA, J.; TORRES, C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 48(10):3996-4001, 2004.

SAINT-RUF, C.; TADDEI, F.; MATIC, I. Stress and survival of aging *Escherichia coli* rpoS colonies. **Genetics**, 168(1):541–546, 2004.

SKURNIK, D.; RUIMY, R.; ANDREMONT, A.; AMORIN, C.; ROUQUET, P.; PICARD, B.; DENAMUR, E. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in

animal faecal *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 57, 1215–1219, 2006.

SMATI, M.; CLERMONT, O.; BLEIBTREU, A.; FOURREAU, F.; DAVID, A.; DAUBIÉ, A.; HIGNARD, C.; LOISON, O.; PICARD, B.; DENAMUR, E. Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. **Microbiology Open**, 4(4): 604–615, 2015.

STEDT, J.; BONNEDAHL, J.; HERNANDEZ, J.; MCMAHON, B. J.; HASAN, B.; OLSEN, B.; DROBNI, M.; WALDENSTRÖM, J. Antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* from gulls in nine European countries. **Infection Ecology Epidemiology**, 4:10.3402/iee.v4.21565, 2014.

SYKES, R. B.; MATTHEW, M. The  $\beta$ -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2:115-157, 1976.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 8:207-217, 2010.

TURKYILMAZ, S.; ESKIIZMIRLILER, S.; TUNALIGIL, S.; BOZDOGAN, B. Identification, characterization and molecular epidemiology of *Escherichia coli* isolated from lamb and goat kids with diarrhoea. **Acta Veterinaria Brno**, 82: 357–362, 2013.

VAN DUIJKEREN, E.; VAN ASTEN, A. J.; GAASTRA, W. Characterization of *Escherichia coli* isolated from adult horses with and without enteritis. **The Veterinary Quarterly**, 22(3):162-166, 2000.

WALK, S. T.; ALM, E. W.; GORDON, D. M.; RAM, J. L.; TORANZOS, G. A.; TIEDJE, J. M.; WHITTAM, T. S. Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. **Applied and Environmental Microbiology**, 75: 6534-6544, 2009.

WASSENAAR, T. M. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and implications for human health. **Critical Reviews in Microbiology**, 31(3):155-169, 2005.

ZIMMERMANN, W.; ROSSELET, A. Function of the Outer Membrane of *Escherichia coli* as a Permeability Barrier to Beta-Lactam Antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 12(3):368-372, 1977.

**Table 1.** Phylogenetic groups found in 130 *E. coli* clones from 26 strains isolated from feces of healthy foals and lambs.

Clones	Strain												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>Foals</b>													
<b>A</b>	C	E	B1	B1	B1	B1	B1	E	C	B1	E	E	B1
<b>B</b>	C	Unknown	B1	B1	Unknown	B1	B1	A	C	B1	E	E	B1
<b>C</b>	C	B1	E	B1	B1	B1	B1	E	C	B1	B1	E	B1
<b>D</b>	C	B1	B1	F	B1	B1	B1	A	C	B1	B1	E	B1
<b>E</b>	C	C	B1	B1	A	E	Unknown	E	Unknown	B1	E	E	B1
<b>DI</b>	0,2	0,8	0,4	0,4	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,2	0,2
<b>Lambs</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b>A</b>	B1	B1	C	C	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	A
<b>B</b>	B1	B1	C	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	E
<b>C</b>	B1	B1	C	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	A
<b>D</b>	B1	B1	C	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	A
<b>E</b>	B1	B1	C	C	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	A
<b>DI</b>	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4

Legend: DI, diversity index.

**Table 2.** Antimicrobial susceptibility profile of 5 *E. coli* strains and their clones (n=5) isolated from feces of healthy foals.

Strain/ Clone	Phylog.	PEN	AMP	XNL	CRO	GM	ENO	CIP	TET	SUL	STX	FFC	ERY
1A	C	R	MS	S	S	S	S	S	S	S	S	MS	R
1B	C	R	MS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
1C	C	R	MS	S	S	S	S	S	S	MS	S	MS	R
1D	C	R	MS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
1E	C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MS	R
2A	E	R	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	MS	MS
2B	Desc.	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	MS	R
2C	B1	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
2D	B1	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	MS	R
2E	C	R	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	MS
5A	B1	R	MS	S	S	S	S	S	R	S	S	MS	MS
5B	Desc.	R	MS	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	S
5C	B1	R	MS	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	S
5D	B1	R	MS	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	S
5E	A	R	MS	S	S	S	S	S	R	S	S	MS	S
6A	B1	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R
6B	B1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
6C	B1	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	MS
6D	B1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
6E	E	R	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
12A	E	R	R	S	S	S	S	S	MS	S	R	S	R
12B	E	R	MS	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	MS
12C	E	R	MS	S	S	S	S	S	R	S	S	S	MS
12D	E	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	MS
12E	E	R	MS	S	S	S	S	S	MS	S	R	S	MS

Legend: PEN, penicillin; AMP, ampicillin; XNL, ceftiofur, CRO, ceftriaxone; GM, gentamicin; ENO, enrofloxacin; CIP, ciprofloxacin; TET, tetracycline; SUL, sulfonamide; STX, trimethoprim-sulfamethoxazole; FFC, florfenicol; ERY, erythromycin; R, resistant; MS, moderately sensitive, S, sensitive.

**Table 3.** Antimicrobial susceptibility profile of 5 *E. coli* strains and their clones (n=5) isolated from feces of healthy lambs.

Strain/ clone	Phylog. Group	PEN	AMP	XNL	CRO	GM	ENO	CIP	TET	SUL	STX	FFC	ERY
1A	B1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
1B	B1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
1C	B1	R	MS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
1D	B1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
1E	B1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
3A	C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
3B	C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
3C	C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
3D	C	R	MS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
3E	C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
4A	C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
4B	B1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
4C	B1	R	MS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
4D	B1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
4E	C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
12A	B1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
12B	B1	R	R	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
12C	B1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
12D	B1	R	MS	S	S	S	MS	S	R	S	S	S	R
12E	B1	R	R	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
13A	A	R	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
13B	E	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
13C	A	R	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
13D	A	R	MS	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
13E	A	R	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	R

See Table 2 for key.

## 5 CAPÍTULO III

### **Diversidade genética e padrões de susceptibilidade de populações de *Escherichia coli* oriundas de bezerros com e sem diarreia**

Genetic diversity and susceptibility patterns of *Escherichia coli* populations from diarrheic and non-diarrheic calves

Jonas Fernandes Maciel<sup>1</sup>, Agueda Castagna de Vargas<sup>1\*</sup>

(Artigo a ser submetido para publicação)

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 97105-900.

\*Autor para correspondência: Tel.: +55 55 3220 8107; fone/fax: 55 3220 8257. E-mail: agueda.vargas@gmail.com



## **Diversidade genética e padrões de susceptibilidade de populações de *Escherichia coli* oriundas de bezerros com e sem diarreia**

Genetic diversity and susceptibility patterns of *Escherichia coli* populations from diarrheic and non-diarrheic calves

### **Resumo**

*Escherichia coli* apresenta grande plasticidade genômica, o que confere a ela grande diversidade genética. Populações de *E. coli* de uma mesma amostra (grupo clonal) foram avaliados quanto aos grupos filogenéticos e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Observou-se que 80% dos grupos clonais de bezerros sem diarreia e 40% de bezerros diarreicos apresentaram diversidade de filo-grupos. A coexistência de filo-grupos considerados patogênicos e não patogênicos foram observados em 60% e 40% dos grupos clonais isolados de bezerros não diarreicos e diarreicos, respectivamente. O filo-grupo B1 foi o mais frequentemente observado entre os grupos clonais: 93,3% nos de bezerros sem diarreia e 80% nos de bezerros diarreicos, seguido do filo-grupo E com 46,7% e 40%, respectivamente. Os filo-grupos D (33,3%) e A (6,7%) foram observados apenas entre os grupos clonais de bezerros diarreicos e B2 (20%) entre os de bezerros sem diarreia. Diversidade entre todos os grupos clonais de bezerros diarreicos foi observada em relação ao perfil *in vitro* de susceptibilidade aos antimicrobianos. Foi observada coexistência de isolados multirresistentes e sensíveis em um mesmo grupo clonal. Tetraciclina (84%), sulfonamida (56%), ampicilina (52%), estreptomicina (48%) e ácido nalidíxico (44%) foram os antimicrobianos com maiores taxas de resistência. Interessantemente, grupos clonais de isolados de bezerros sem diarreia não apresentaram multirresistência. Os resultados obtidos nesse estudo representam a diversidade genética e fenotípica de *E. coli* com importantes implicações para o diagnóstico bacteriológico, principalmente em relação à seleção de cepas resistentes.

Palavras-chave: Filo-grupo, perfil de susceptibilidade, variabilidade filogenética, grupo clonal

### **Abstract**

The genome plasticity of *Escherichia coli* could affect the bacterial fitness and genotypes. *E. coli* populations of the same sample (clonal groups) were evaluated for phylogenetic groups and antimicrobial susceptibility profile. In this study, we observed *E. coli* phylogenetic group diversity in 80% of the clonal bacteria from the tested calves without

diarrhea and in 40% of the clonal bacteria from calves with diarrhea. Moreover, we have found coexistence of pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups in 60% and 40% of the clonal bacteria from non-diarrheic and diarrheic calves, respectively. The phylo-group B1 was the most frequently observed among the clonal groups: 93.3% in calves without diarrhea and 80% in diarrheic calves, followed by phylo-group E with 46.7% and 40%, respectively. The phylo-groups D (33.3%) and A (6.7%) were observed only in the clonal groups from diarrheic calves, while B2 phylo-group (20%) was present only in the calves without diarrhea. Interestingly, a high variability in the antimicrobial resistance profile was detected among the clonal groups from diarrheic calves, in addition to the coexistence of multiresistant and sensible isolates in the same *E. coli* clonal groups. The drugs with the high resistance rates are: tetracycline (84%), sulfonamide (56%), ampicillin (52%), streptomycin (48%) and nalidixic acid (44%). In contrast, *E. coli* clonal groups from calves without diarrhea did not presented multiresistant profile. Our results highlight the *E. coli* genetic diversity and antimicrobial resistance profile, which may influence in the bacteriological diagnostic, mainly by the selection of resistant strains.

Key words: phylo-group, susceptibility profile, phylogenetic variability, clonal group.

## 1. Introdução

*E. coli* apresenta grande variabilidade genética, principalmente em decorrência da transferência horizontal de genes entre subpopulações (CROXEN & FINLAY, 2010; GOMES et al., 2016). A aquisição de genes de virulência, de resistência aos antimicrobianos e entre outros, conferem heterogeneidade em populações de *E. coli*, possibilitando maior adaptação em diferentes nichos e capacidade de causar danos ao hospedeiro (KAPER et al., 2004). Essa variabilidade é decorrente, em grande parte, da elevada densidade bacteriana no intestino associado a grande plasticidade genômica de *E. coli* (KAPER et al., 2004; CROXEN et al., 2013; SHIN et al., 2015).

A microbiota intestinal de bovinos e da maioria dos animais domésticos apresenta de forma predominante *E. coli* pertencente à grupos filogenéticos comensais. Dentre esses, o filo-grupo B1 é considerado o mais prevalente (TENAILLON et al., 2010; COURA et al., 2016). Porém, em função da diversidade genética de *E. coli*, pouco se sabe sobre variações filogenéticas que podem ocorrer em um determinado nicho.

Paralelamente, a constante utilização de antimicrobianos na produção animal, seja de maneira profilática ou terapêutica, pode favorecer a pressão seletiva para cepas bacterianas

resistentes em *E. coli* patogênicas ou comensais (KAESBOHRER et al., 2012; CHANTZIARAS et al., 2014). Como consequência, cepas resistentes, bem como genes de resistência, podem se disseminar de animais para humanos, seja pelo contato direto, contaminação do ambiente ou pela cadeia alimentar (GEENEN et al., 2010).

A diarreia em bezerros é considerada uma síndrome multifatorial, cujo evento desencadeante pode estar relacionado ao ambiente, hospedeiro ou ao agente infeccioso envolvido. Nas diarreias causadas por *E. coli*, dados apontam para a importante participação de populações da microbiota intestinal. Neste sentido, mudanças no perfil genético das subpopulações de *E. coli* predominantes no trato intestinal podem ser relacionadas ao desencadeamento da infecção. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi comparar, quanto ao perfil genético e quanto à resistência aos antimicrobianos, subpopulações de *E. coli* isoladas de fezes de bezerros com e sem diarreia.

## 2. Material e métodos

Foram selecionadas 15 amostras de fezes de bezerros sem diarreia e outras 15 amostras de bezerros diarreicos de 30 a 60 dias de idade provenientes de dois estabelecimentos de criação bovina de corte da região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, e que foram enviadas para a rotina diagnóstica do Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Para obtenção dos isolados, as amostras de fezes foram cultivadas em ágar MacConkey (Himedia, Mumbai, Índia), seguido da identificação bacteriana a partir dos resultados obtidos nas séries bioquímicas (MACFADDIN, 2000).

Cada uma das amostras cultivadas constituiu um grupo clonal. Dessa forma, foram selecionadas cinco colônias isoladas de cada grupo clonal, totalizando 75 isolados de bezerros sem diarreia e 75 de bezerros diarreicos.

Os isolados de cada grupo clonal foram submetidos à extração de DNA pelo método de fervura (SAMBROOK & RUSSELL, 2001) e posteriormente realizado PCR *quadruplex* para os genes *chuA*, *yjaA*, *arpA* e fragmento de DNA denominado TspE4.C2, para tipificação filogenética de *E. coli*, seguindo o estabelecido por Clermont et al. (2013). Foi calculado o índice de diversidade (ID) de cada grupo clonal.

Objetivando avaliar a ocorrência de variabilidade fenotípica nos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos foram eleitos cinco grupos clonais (modo amostral de 33%) para avaliação do perfil *in vitro* de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados que os compunham, totalizando, assim, 25 isolados selecionados para esta etapa do estudo.

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) dos isolados pertencentes aos grupos clonais foi realizado como recomendado pelo guia *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Quinze agentes antimicrobianos de sete diferentes classes foram testados: i) Beta-lactâmicos: ampicilina (AMP; 10µg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC; 20µg/10µg), ceftiofur (CTF; 30µg) e cefepime (CPM; 30µg); ii) Aminoglicosídeos: gentamicina (GEN; 10µg), neomicina (NEO; 30µg), estreptomina (EST; 10µg) e ampicacina (AMI; 30µg); iii) Fluoroquinolonas: enrofloxacina (ENO; 5µg), ciprofloxacina (CIP; 5µg) e ácido nalidíxico (NAL; 30µg), iv) Tetraciclina: Tetraciclina (TET; 30µg); v) Sulfonamidas: Sulfonamida (SUL; 300µg); sulfametoxazol/trimetoprim (SUT; 25µg) e vi) Anfencicols: florfenicol (FLF; 30µg). Os discos de antimicrobianos foram comercialmente adquiridos de Laborclin® (Pinhais, PR, Brasil). Foi utilizada *E. coli* ATCC 25922 como controle de qualidade para todos os testes. Os isolados multirresistentes foram definidos como aqueles com resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos (BRYAN et al., 2010).

O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) de cada isolado foi calculado com base no método descrito por Krumperman (1983). Também foi calculado o IRMA para cada grupo clonal como preconizado por Krumperman (1983), utilizando-se a seguinte equação:  $a/(b \cdot c)$ , onde  $a$  representa a resistência antimicrobiana agregada dos isolados do grupo clonal,  $b$  o número de antimicrobianos aos quais os isolados do grupo foram expostos e  $c$  número de isolados que compõe o grupo clonal. A partir dos isolados caracterizados como multirresistentes, estabeleceu-se o valor mínimo do IRMA para essa característica.

Para avaliar o IRMA dos grupos clonais de bezerros saudáveis e diarreicos foi utilizado o teste do qui-quadrado. Os isolados dos grupos clonais de bezerros diarreicos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis. Quando identificadas diferenças entre isolados, aplicou-se o teste de Bonferroni para a comparação das médias. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS, versão 9.4 (SAS, 2012).

### 3. Resultados e discussão

A partir dos ensaios de tipificação filogenética (CLERMONT et al., 2013) observou-se grande variabilidade entre as cinco colônias de *E. coli* selecionadas a partir de cada amostra (grupos clonais). Dos 15 grupos clonais de *E. coli* de bezerros sem diarreia, em 12 (80%) observou-se variação filogenética (Tabela 1). Já entre os 15 grupos clonais de *E. coli* de bezerros diarreicos, a diversidade de grupos filogenéticos foi inferior, sendo observada em seis grupos (40%) (Tabela 2). Os grupos clonais com variabilidade filogenética, ou seja, onde

verificou-se coexistência de pelo menos dois grupos filogenéticos, apresentaram um índice de diversidade (ID) mínimo de 0,4 (Tabelas 1 e 2). O ID médio observado entre os grupos clonais de bezerros diarreicos foi 0,33, abaixo do índice dos grupos clonais que apresentaram variabilidade. Por outro lado, o ID médio nos grupos clonais de bezerros sem diarreia confirma o alto percentual de variabilidade genética observada na tipificação (Tabelas 1 e 2).

A tipificação filogenética possibilitou estabelecer o filo-grupo B1 como o mais frequente entre os isolados de todos os grupos clonais. O filo-grupo B1 esteve presente em 14 grupos clonais de bezerros sem diarreia (93,3%) e em 12 de bezerros com diarreia (80%). Atualmente, esse filo-grupo é considerado o grupo majoritário de isolados de *E. coli* provenientes de fezes de bovinos, além de serem identificados em outros animais domésticos (SON et al., 2009; TENAILLON et al., 2010, BESSALAH et al., 2016; COURA et al., 2016, SOUTO et al., 2017). Apesar de ser considerado um grupo predominantemente comensal (CLERMONT et al., 2013), o filo-grupo B1 também pode conter isolados pertencentes a patotipos diarreiogênicos (LEIMBACH et al., 2013). Desta forma, estes dados corroboram com a elevada frequência desse filo-grupo entre as subpopulações de *E. coli* isoladas de amostras clínicas no presente estudo.

Como pode-se observar nas Tabelas 1 e 2, outros filo-grupos também foram identificados. O filo-grupo E, segundo mais frequente, foi observado em sete grupos clonais de bezerros sem diarreia (46,7%) e em seis de bezerros diarreicos (40%). D e A foram verificados somente nos grupos clonais de bezerros diarreicos (33,3% e 6,7% respectivamente), enquanto que B2 foi observado somente nos grupos clonais isolados de bezerros sem diarreia (20%). Interessantemente, dentre todos os isolados deste estudo, 15 (10%) não se enquadraram em nenhum dos filo-grupos, pelo método de classificação empregado. Por fim, foi observado grande variabilidade nas subpopulações de *E. coli* estudadas, independente do *status* sanitário dos animais.

A classificação filogenética de Clermont et al. (2013) possibilita prever o potencial patogênico de isolados de *E. coli*, independente da amostra biológica, como é o caso dos filo-grupos B2, D, E e F. O grupo B2 e D compreendem principalmente cepas principalmente extraintestinais, porém o grupo D descende de mais de um ancestral, incluindo isolados ambientais. O filo-grupo E tem como integrante mais conhecido o sorotipo O157:H7 e o filo-grupo F, mais recentemente documentado, descende de isolados do filo-grupo B2 e também composto por cepas extraintestinais (CLERMONT et al., 2013; LEIMBACH et al., 2013).

Em nove grupos clonais (60%) de *E. coli* de bezerros sem diarreia (1A, 1B, 3T, 4T, 5A, 5C, 5D, 5E e 5G) e em sete de bezerros diarreicos (46,7%) (5, V07, 722, 733, 742, 745 e

747), houve a presença de pelo menos um isolado pertencente a filo-grupos considerados patogênicos, ou seja, observou-se coexistência de populações com potencial patogênico e não patogênico (Tabela 1 e 2, respectivamente) em ambos *status*.

Ao todo 25 isolados de cada *status* foram submetidos ao ensaio de TSA. Dentre os 15 antimicrobianos testados, observou-se ampla resistência dos grupos clonais de bezerros diarreicos ( $P < 0,05$ ). Tetraciclina foi o antimicrobiano com a maior taxa de resistência (84%) entre os isolados, seguido de sulfonamida (56%), ampicilina (52%), estreptomicina (48%) e ácido nalidíxico (44%; 11/25). O Quadro 1 apresenta o perfil de susceptibilidade *in vitro* de cada grupo clonal em relação aos cinco antimicrobianos que apresentaram as maiores taxas de resistência.

Os perfis de resistência dos isolados à tetraciclina, sulfonamida, ampicilina, estreptomicina e ácido nalidíxico observados nos diferentes grupos clonais de bezerros diarreicos (Quadro 1) seguem uma tendência mundial, que aponta os maiores índices de resistência de *E. coli* aos antimicrobianos supracitados (KHACHATRYAN et al., 2006; BOSMAN et al., 2014; CHENEY et al., 2015; HANON et al., 2015; SHIN et al., 2015). Porém, destacam-se os fenótipos distintos entre isolados de cada grupo clonal, demonstrando a constante seleção de cepas resistentes com grande impacto no diagnóstico bacteriológico.

Com o emprego do cálculo do IRMA demonstrou-se que nenhum dos isolados dos grupos clonais de *E. coli* de bezerros sem diarreia apresentou multirresistência. Todos os isolados desses grupos apresentaram  $IRMA \leq 0,133$ . Já dentre os grupos clonais representativos de isolados de bezerros diarreicos observou-se multirresistência em todos eles. A análise detalhada de cada um desses grupos clonais aponta a existência de pelo menos um isolado resistente a pelo menos três classes de antimicrobianos. O valor mínimo do IRMA dos isolados considerados multirresistentes foi estabelecido em  $\geq 0,200$ . Analisando a Tabela 3, podemos observar a ocorrência de variação em todos os grupos clonais.

O grupo clonal “5” foi o que apresentou maior número de isolados multirresistentes e “733” e “V07” os com menor número. Os demais grupos clonais foram intermediários. Em relação a variabilidade dentro de cada grupo clonal, “V07” e “733” apresentaram maior variação, com coeficientes de variabilidade de 94,79% e 60,19%, respectivamente. O grupo clonal “733” apresentou média abaixo do ponto de corte para multirresistência (0,187), porém dois isolados desse grupo apresentaram valores de IRMA superiores a 0,200 (Tabela 3).

Essa variação fenotípica quanto ao perfil *in vitro* de sensibilidade aos antimicrobianos observada dentro dos grupos clonais de *E. coli* é de grande relevância uma vez que a mesma pode indicar que subpopulações deste micro-organismo podem estar sofrendo seleção para

resistência antimicrobiana. Em todos os casos, observa-se subpopulações mais resistentes que outras, o que pode ser em decorrência do uso imprudente de antimicrobianos na produção animal, tanto de forma terapêutica quanto profilática.

É relevante ressaltar a grande variação no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dentro de cada grupo clonal (Quadro 1), a qual indica a diversidade das diferentes populações de *E. coli* que podem ser encontradas a partir de uma amostra biológica. Esse dado é preocupante, uma vez que durante a rotina diagnóstica, isolados com distintos perfis de sensibilidade podem ser selecionados para representar uma determinada população, ao passo que isolados com perfis de resistência podem ser negligenciados e assim perpetuados, sendo responsáveis por infecções refratárias à terapia antimicrobiana e, portanto, recorrentes.

#### 4. Conclusões

Os resultados obtidos nesse estudo revelaram uma grande diversidade genética e fenotípica de populações de *E. coli*, uma vez que, em uma mesma amostra biológica podem coexistir grupos filogenéticos e perfis de susceptibilidade a antimicrobianos distintos, com importantes implicações, principalmente em relação a seleção de isolados resistentes e à capacidade de causar prejuízos ao hospedeiro.

#### Agradecimentos

Os autores são gratos às agências brasileiras de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul subsídio número 68.902.901.582.806.000.000 (FAPERGS/CAPES 17/2012) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior subsídio número 2734/2011 (PNPD) pelo apoio financeiro.

#### Referências

BESSALAH, S.; FAIRBROTHER, J. M.; SALHI, I.; VANIER, G.; KHORCHANI, T.; SEDDIK, M. M.; HAMMADI, M. Antimicrobial resistance and molecular characterization of virulence genes, phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy camel-calves in Tunisia. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 49:1-7, 2016.

BRYAN, J.; LEONARD, N.; FANNING, S.; KATZ, L.; DUGGAN, V. Antimicrobial resistance in commensal faecal *Escherichia coli* of hospitalized horses. **Irish Veterinary Journal**, 63(6):373-379, 2010.

CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B.; DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 69:827-834, 2014.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, 5(1):58e65, 2013.

Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Testing for Bacteria Isolated from Animals: Second Informational Supplement VET01-S2, CLSI, Wayne, PA, USA, 2013.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, 8:26-38, 2010.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, 26(4):822-880, 2013.

GEENEN, P. L.; KOENE, M. G. J.; BLAAK, H.; HAVELAAR, A. H.; van de GIESSEN. **Risk profile on antimicrobial resistance transmissible from food animals to humans.** RIVM-rapport 330334001, 2010.

GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P.; SCALETISKY, I. C. A.; GUTH, B. E. C.; RODRIGUES, J. F.; PIAZZA, R. M. F.; FERREIRA, L. C. S.; MARTINEZ, M. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 47S:3-30, 2016.

KAESBOHRER, A.; SCHROETER, A.; TENHAGEN, B. A.; ALT, A.; GUERRA, B.; APPEL, B. Emerging Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia coli* with Public Health Relevance. **Zoonoses and Public Health**, 59:158-165, 2012.



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

KRUMPERMAN, P. H. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. **Applied and Environmental Microbiology**, 46(1):165-170, 1983.

LEIMBACH, A.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. E. coli as an All-Rounder: Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 358: 3–32, 2013.

LIBARDONI, F.; VIELMO, A.; FARIAS, L.; MATTER, L. B.; PÖTTER, L.; SPILKI, F. R.; VARGAS, A. C. Diversity of seM in *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from strangles outbreaks. **Veterinary Microbiology**, 162:663-669, 2013.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 3 ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Preparation and analysis of Prokaryotic genomic DNA**. In: Molecular Cloning. 3rd ed. v.1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.6.62, 2001.

SAS Institute. 2012. SAS 9.4 for Windows. . SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

SHIN, S. W.; SHIN, M. K.; JUNG, M.; BELAYNEHE, K. M.; YOO, H. S. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Transfer of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Beef Cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, 81(16):5560-5566, 2015.

SON, I.; VAN KESSEL, J. A. S.; KARNS, J. S. Genotypic Diversity of *Escherichia coli* in a Dairy Farm. **Foodborne Pathogens and Disease**, 6(7):837-847, 2009.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 8:207-217, 2010.

**Tabela 1.** Diversidade filogenética de grupos clonais de *E. coli* oriundos de fezes de bezerros sem diarreia.

Grupos clonais		Grupo Filogenético	Grupos clonais		Grupo Filogenético
<b>1A</b> (0,4)*	<b>1A1</b>	Desconhecido	<b>5B</b> (0,4)*	<b>5B1</b>	Desconhecido
	<b>1A2</b>	Desconhecido		<b>5B2</b>	B1
	<b>1A3</b>	Desconhecido		<b>5B3</b>	B1
	<b>1A4</b>	E		<b>5B4</b>	Desconhecido
	<b>1A5</b>	E		<b>5B5</b>	B1
<b>1B</b> (0,4)*	<b>1B1</b>	B1	<b>5C</b> (0,4)*	<b>5C1</b>	E
	<b>1B2</b>	E		<b>5C2</b>	E
	<b>1B3</b>	E		<b>5C3</b>	E
	<b>1B4</b>	E		<b>5C4</b>	E
	<b>1B5</b>	B1		<b>5C5</b>	B1
<b>1C</b> (0,2)*	<b>1C1</b>	B1	<b>5D</b> (0,6)*	<b>5D1</b>	B2
	<b>1C2</b>	B1		<b>5D2</b>	B1
	<b>1C3</b>	B1		<b>5D3</b>	B1
	<b>1C4</b>	B1		<b>5D4</b>	Desconhecido
	<b>1C5</b>	B1		<b>5D5</b>	Desconhecido
<b>1D</b> (0,2)*	<b>1D1</b>	B1	<b>5E</b> (0,4)*	<b>5E1</b>	B1
	<b>1D2</b>	B1		<b>5E2</b>	B1
	<b>1D3</b>	B1		<b>5E3</b>	B1
	<b>1D4</b>	B1		<b>5E4</b>	E
	<b>1D5</b>	B1		<b>5E5</b>	B1
<b>2T</b> (0,4)*	<b>2T1</b>	Desconhecido	<b>5F</b> (0,4)*	<b>5F1</b>	B1
	<b>2T2</b>	B1		<b>5F2</b>	Desconhecido
	<b>2T3</b>	B1		<b>5F3</b>	Desconhecido
	<b>2T4</b>	Desconhecido		<b>5F4</b>	B1
	<b>2T5</b>	B1		<b>5F5</b>	Desconhecido
<b>3T</b> (0,6)*	<b>3T1</b>	B2	<b>5G</b> (0,4)*	<b>5G1</b>	B1
	<b>3T2</b>	Desconhecido		<b>5G2</b>	B1
	<b>3T3</b>	B1		<b>5G3</b>	B1
	<b>3T4</b>	B1		<b>5G4</b>	B1
	<b>3T5</b>	Desconhecido		<b>5G5</b>	E
<b>4T</b> (0,4)*	<b>4T1</b>	B1	<b>5H</b> (0,2)*	<b>5H1</b>	B1
	<b>4T2</b>	B1		<b>5H2</b>	B1
	<b>4T3</b>	B1		<b>5H3</b>	B1
	<b>4T4</b>	E		<b>5H4</b>	B1
	<b>4T5</b>	B1		<b>5H5</b>	B1
<b>5A</b> (0,6)*	<b>5A1</b>	B1	ID Médio= 0,4		
	<b>5A2</b>	E			
	<b>5A3</b>	B1			
	<b>5A4</b>	B2			
	<b>5A5</b>	B1			

\*ID= Índice de Diversidade

**Tabela 2.** Diversidade filogenética de grupos clonais de *E. coli* oriundos de bezerros com diarreia.

Grupos clonais		Grupo Filogenético	Grupos clonais		Grupo Filogenético
<b>000</b> (0,2)*	<b>000A</b>	B1	<b>V07</b> (0,4)*	<b>V07A</b>	B1
	<b>000B</b>	B1		<b>V07B</b>	E
	<b>000C</b>	B1		<b>V07C</b>	E
	<b>000D</b>	B1		<b>V07D</b>	B1
	<b>000E</b>	B1		<b>V07E</b>	B1
<b>1</b> (0,2)*	<b>1A</b>	B1	<b>722</b> (0,2)*	<b>722-1</b>	D
	<b>1B</b>	B1		<b>722-2</b>	D
	<b>1C</b>	B1		<b>722-3</b>	D
	<b>1D</b>	B1		<b>722-4</b>	D
	<b>1E</b>	B1		<b>722-5</b>	D
<b>4</b> (0,2)*	<b>4A</b>	B1	<b>733</b> (0,6)*	<b>733-1</b>	B1
	<b>4B</b>	B1		<b>733-2</b>	B1
	<b>4C</b>	B1		<b>733-3</b>	E
	<b>4D</b>	B1		<b>733-4</b>	D
	<b>4E</b>	B1		<b>733-5</b>	B1
<b>5</b> (0,6)*	<b>5A</b>	B1	<b>737</b> (0,2)*	<b>737-1</b>	B1
	<b>5B</b>	E		<b>737-2</b>	B1
	<b>5C</b>	D		<b>737-3</b>	B1
	<b>5D</b>	B1		<b>737-4</b>	B1
	<b>5E</b>	E		<b>737-5</b>	B1
<b>6</b> (0,2)*	<b>6A</b>	B1	<b>742</b> (0,6)*	<b>742-1</b>	B1
	<b>6B</b>	B1		<b>742-2</b>	E
	<b>6C</b>	B1		<b>742-3</b>	E
	<b>6D</b>	B1		<b>742-4</b>	E
	<b>6E</b>	B1		<b>742-5</b>	D
<b>V04</b> (0,2)*	<b>V04A</b>	B1	<b>745</b> (0,4)*	<b>745-1</b>	E
	<b>V04B</b>	B1		<b>745-2</b>	E
	<b>V04C</b>	B1		<b>745-3</b>	D
	<b>V04D</b>	B1		<b>745-4</b>	E
	<b>V04E</b>	B1		<b>745-5</b>	E
<b>V05</b> (0,2)*	<b>V05A</b>	B1	<b>747</b> (0,6)*	<b>747-1</b>	E
	<b>V05B</b>	B1		<b>747-2</b>	A
	<b>V05C</b>	B1		<b>747-3</b>	A
	<b>V05D</b>	B1		<b>747-4</b>	A
	<b>V05E</b>	B1		<b>747-5</b>	Desconhecido
<b>V06</b> (0,2)*	<b>V06A</b>	B1	ID Médio= 0,33		
	<b>V06B</b>	B1			
	<b>V06C</b>	B1			
	<b>V06D</b>	B1			
	<b>V06E</b>	B1			

\* ID=Índice de Diversidade

**Quadro 1.** Perfil de susceptibilidade *in vitro* de diferentes grupos clonais de *E. coli* de bezerros diarreicos a seis antimicrobianos com maiores taxas de resistência.

Grupos clonais		AMP	EST	NAL	TET	SUL	Grupos clonais		AMP	EST	NAL	TET	SUL
000	000A						733	733-1					
	000B							733-2					
	000C							733-3					
	000D							733-4					
	000E							733-5					
5	5A						742	742-1					
	5B							742-2					
	5C							742-3					
	5D							742-4					
	5E							742-5					
V07	V07A												
	V07B												
	V07C												
	V07D												
	V07E												

Áreas hachuradas indicam isolados resistentes.

AMP: ampicilina; EST: estreptomicina; NAL: ácido nalidíxico; TET: tetraciclina; SUL: sulfonamida.

**Tabela 3.** Valores do IRMA dos isolados de *E. coli* de bezerros diarreicos e dos seus respectivos grupos clonais.

Grupos clonais		IRMA	Grupos clonais		IRMA
<b>000</b> (0,200)*	<b>000A</b>	0,133	<b>733</b> (0,187)*	<b>733-1</b>	0,333
	<b>000B</b>	0,200		<b>733-2</b>	0,333
	<b>000C</b>	0,267		<b>733-3</b>	0,000
	<b>000D</b>	0,200		<b>733-4</b>	0,133
	<b>000E</b>	0,200		<b>733-5</b>	0,133
<b>5</b> (0,400)*	<b>5A</b>	0,467	<b>742</b> (0,240)*	<b>742-1</b>	0,200
	<b>5B</b>	0,267		<b>742-2</b>	0,267
	<b>5C</b>	0,400		<b>742-3</b>	0,133
	<b>5D</b>	0,467		<b>742-4</b>	0,267
	<b>5E</b>	0,400		<b>742-5</b>	0,333
<b>V07</b> (0,200)*	<b>V07A</b>	0,000			
	<b>V07B</b>	0,000			
	<b>V07C</b>	0,133			
	<b>V07D</b>	0,200			
	<b>V07E</b>	0,200			

\*Valor do IRMA correspondente ao grupo clonal  
 Coeficiente de variação: V07= 94,79%; 733= 60,19%

## 6 CAPÍTULO IV

### **Grupos filogenéticos, fatores de virulência e resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isolada de bezerros com e sem diarreia**

Phylogenetic groups, virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from calves with and without diarrhea

Jonas Fernandes Maciel<sup>a</sup>, Agueda Castagna de Vargas<sup>a\*</sup>

(Artigo a ser submetido para publicação)

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 97105-900.

\*Autor para correspondência: Tel.: +55 55 3220 8107; fone/fax: +55 3220 8257. E-mail: agueda.vargas@gmail.com

**Grupos filogenéticos, fatores de virulência e resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isolada de bezerros com e sem diarreia**

Phylogenetic groups, virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from calves with and without diarrhea

**Resumo**

*Escherichia coli* é uma bactéria que apresenta grande diversidade genética, principalmente no que se refere aos fatores de virulência, e com isso dispõe de uma grande variedade de patotipos. Neste estudo objetivou-se caracterizar isolados de *E. coli* provenientes de bezerros com e sem sinal clínico de diarreia, estabelecendo diferenças no que abrange grupos filogenéticos, fatores de virulência (curli; celulose; fímbrias: F4, F5, F6, F18 e F41; e toxinas: STa, STb, LT e Stx2) e perfil de susceptibilidade antimicrobiana. Os isolados de *E. coli* de bezerros sem diarreia foram classificados segundo o grupo filogenético em B1 (83,3%; 25/30); E (10%; 3/30) e desconhecidos (6,7%; 2/30), enquanto os isolados recuperados de bezerros com diarreia, foram classificados em B1 (70%; 21/30), B2 (3,33%; 1/30), C (3,33%; 1/30), D (3,33%; 1/30), E (13,33%; 4/30) e desconhecidos (6,7%; 2/30), mostrando uma maior diversidade filogenética no último grupo. Nenhum isolado do grupo de bezerros sem diarreia foi caracterizado como multirresistente, porém o grupo dos bezerros diarreicos apresentou 16 isolados multirresistentes (53,3%). Não foi detectada a presença de genes para fímbrias entre os isolados de bezerros sem diarreia, enquanto que 30% (9/30) dos isolados de bezerros diarreicos foram positivos para esse fator de virulência, sendo 16,7% (5/30) para F5 e 13,3% (4/30) para F18. No entanto, genes para toxinas estavam presentes em 28 (93,3%) isolados de animais sem diarreia, sendo a STb (66,7%; 20/30) a mais encontrada, seguida de LT (56,7%; 17/30) e STa (33,3%; 10/30). Já dentre os isolados de bezerros diarreicos, a maioria dos isolados não apresentou gene para toxinas (70%; 21/30), sendo que 7 (23,3%) foram positivos para LT, 1 (3,3%) para STa, 1 (3,3%) para STb e 1 (3,3%) para STx2. Curli e celulose mostraram-se altamente presentes em ambos os grupos, 96,7% (29/30) e 83,3% (25/30) foram positivos para o gene *csgA* e para o gene *bcsA*, respectivamente, em isolados de bezerros sem diarreia, enquanto 90% (27/30) foram positivos para *csgA* e para *bcsA* para isolados de bezerros diarreicos. A formação de biofilme não se mostrou uma característica importante em ambos os grupos de isolados. O grupo filogenético B1 predomina tanto em isolados comensais como em isolados associados aos processos diarreicos; isolados de *E. coli* comensais podem ser portadores de genes toxigênicos como STb, LT, STa; curli e celulose

são genes importantes para a isolados de origem intestinal bovina, pois se conservam com a evolução; e por último, isolados de *E. coli* presentes em animais doentes apresentaram um perfil de resistência muito superior devido provavelmente à exposição maior aos antimicrobianos.

Palavras-chave: Filo-grupo, fímbrias, toxinas, curli, celulose, multirresistencia.

### Abstract

*Escherichia coli* exhibit great genetic diversity, especially in relation to the virulence factors, what creates a wide variety of pathotypes. The aim of this study was to characterize *E. coli* isolates from 30 calves with and without diarrhea, establishing differences about phylogenetic groups, virulence factors (curli; cellulose; fimbriae: F4, F5, F6, F18, F41; and toxins: STa, STb, LT and Stx2) and antimicrobial susceptibility profile. *E. coli* isolates from calves without diarrhea were classified according to the phylogenetic group in B1 (83.3%, 25/30); ; E (10%; 3/30) and unknown (6.7%; 2/30), whereas the isolates recovered from calves with diarrhea were classified as B1 (70%, 21/30), B2 (3.33%), C (3.33%, 1/30), D (3.33%, 1/30), E (13.33%, 4/30) and unknown (6.7%; / 30), showing a greater phylogenetic diversity in the latter group. No isolates from the calves without diarrhea group were characterized as multiresistant, but the diarrheic calf group presented 16 multiresistant isolates (53.3%). In the isolates of calves without diarrhea, the presence of genes for fimbriae was not detected, whereas 30% (9/30) of the isolates of diarrheic calves were positive for this virulence factor, being 16.7% (5/30) for F5 and 13.3% (4/30) for F18. However, genes for toxins were present in 28 (93.3%) isolates from animals without diarrhea, with STb (66.7%, 20/30) being the most found, followed by LT (56.7%; 17/30) and STa (33.3%, 10/30). Among the isolates from diarrheal calves, most of them did not present a gene for toxins (70%; 21/30); but 7 (23.3%) were positive for LT, 1 (3.3%) for STa, 1 (3.3%) for STb and 1 (3.3%) for STx2. Curli and cellulose were highly present in both groups, 96.7% (29/30) and 83.3% (25/30) were positive for *csgA* and *bcsA* genes respectively, in isolates from animals without diarrhea, whereas 90% (27/30) were positive for *csgA* and *bcsA* in diarrheal calves isolates. Biofilm formation did not to be an important feature in both groups of isolates. The phylogenetic group B1 predominates in both commensal isolates and isolates associated with diarrheal processes; *E. coli* isolates may be carriers of toxigenic genes such as *STb*, *LT*, *STa*; Curli and cellulose are important genes for bovine intestinal isolates, as they are conserved



with the evolution; and finally, *E. coli* isolates present in diseased animals showed a much higher resistance profile probably due to higher exposure to antimicrobials.

**Key words:** Phylo-group, fimbriae, toxins, curli, cellulose, multidrug resistance.

## 1. Introdução

*Escherichia coli* é um componente da microbiota intestinal dos animais e dos humanos (TENAILLON et al., 2010), apesar disso, algumas cepas adquirem fatores de virulência tornando-se patogênicas. Entre os diversos patotipos, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é um dos principais agentes envolvidos em diarreias em bezerros com menos de 21 dias de idade, representando prejuízo no desenvolvimento desses animais (FOSTER & SMITH, 2009; CONSTABLE, 2008) e elevado impacto econômico na pecuária (TREVISI et al., 2014).

Diversos estudos têm demonstrado que isolados de *E. coli* a partir de fezes de bovinos são majoritariamente classificados no filo-grupo B1, grupo considerado comensal (SON et al., 2009; COURA et al., 2017), mesmo predomínio observado na maioria dos animais domésticos (TENAILLON et al., 2010). Essa filo-tipificação tem utilizado tanto a metodologia de Clermont et al. (2000) quanto a de Clermont et al. (2013), sendo a mais recente, ainda pouco utilizada para isolados de bovinos.

Na patogênese da infecção por *E. coli* no intestino, a adesão é fundamental para que ocorra a colonização, pois em condições normais a bactéria é eliminada junto às fezes (FOSTER & SMITH, 2009; TENAILLON et al., 2010). Fímbrias são consideradas as adesinas mais importantes envolvidas no mecanismo de colonização do intestino. As fímbrias de isolados de *E. coli* de origem animal melhor caracterizadas são F4 (k88), F5 (K99), F6 (987P), F17 e F18 (GYLES & FAIRBROTHER, 2010). Segundo o trabalho de Nguyen et al. (2011), F5 e F41 foram as fímbrias mais comumente presentes em isolados de *E. coli* de bezerros com diarreia. Além disso, enterotoxinas como LT (*heat-labile toxin*), STa e STb (*heat-stable toxins a and b*) induzem a produção de diarreia pelo estímulo à secreção de fluidos no lúmen intestinal (DUBREUIL et al., 2016).

Além das fímbrias já conhecidas, curli e celulose tem sido investigados como importantes componentes da matriz extracelular, estando diretamente associados à habilidade de formação de biofilme em isolados comensais e clínicos humanos (BOKRANZ et al., 2005; BARNHART & CHAPMAN, 2006; SALDAÑA et al., 2009; SERRA & HENGGE, 2014), porém pouco se sabe sobre sua frequência em isolados clínicos e comensais bovinos.

Estudos epidemiológicos têm descrito que ETEC está entre as principais causas de diarreia neonatal em bezerros. Essa enfermidade é considerada o maior desafio na pecuária de corte e de leite, refletindo num aumento do uso de antimicrobianos (FOSTER & SMITH, 2009; AL MAWLY et al., 2015). Esse aumento na utilização de antimicrobianos, além dos custos, tem relação direta com a seleção de isolados de *E. coli* resistentes em diferentes países (CHANTZIARAS et al., 2014).

Em vista disso, o objetivo do presente estudo foi caracterizar isolados de *E. coli* provenientes de bezerros com e sem sinal clínico de diarreia, estabelecendo diferenças no que abrange grupos filogenéticos, fatores de virulência e perfil de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Isolamento e extração de DNA de *E. coli*

Foram investigados 60 isolados de *E. coli* de fezes de bezerros, sendo 30 isolados provenientes de bezerros sem sinais clínicos de diarreia e 30 isolados de bezerros com diarreia. Os bezerros desse estudo apresentavam idades entre 21 e 60 dias, oriundos de propriedades rurais da região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A amostragem dos isolados desse estudo se deu por conveniência.

Os isolados de *E. coli* de bezerros sem sinais clínicos de diarreia foram reunidos a partir de amostras de fezes coletadas diretamente da ampola retal dos animais, seguido de isolamento e identificação fenotípica por meio de características morfo-tintoriais segundo Quinn et al. (1994). Os isolados de *E. coli* de bezerros com diarreia, eram provenientes do acervo de liofilizados do Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da UFSM. Entre os anos de 1996 e 2015 esses isolados foram identificados fenotipicamente, e mantidos liofilizados e armazenados a -20°C. O DNA dos isolados foi extraído através do método de fervura de acordo com Sambrook & Russel et al. (2013).

### 2.2 Grupos filogenéticos

Os isolados de ambos os grupos foram classificados em grupos filogenéticos de acordo com Clermont et al. (2013). Esta metodologia baseia-se em uma PCR *quadruplex* inicial abrangendo os genes *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2 e *arpA*, e uma simples em seguida direcionada aos Grupos filogenéticos C e E. Deste modo, esse método possibilita a classificação em sete grupos filogenéticos de *E. coli stricto sensu* (A, B1, B2, C, D, E e F) e também a classificação de *E. coli* – Clado I.

## 2.3 Fatores de Virulência

### 2.3.1 Fímbrias e toxinas

Para a determinação da presença de fímbrias (F4, F5, F6, F18 e F41) e toxinas (STa, STb, LT e Stx2), os isolados foram submetidos à duas PCR *multiplex* de acordo com as condições preconizadas por Costa et al. (2006).

### 2.3.2 Curli e celulose

Os genes do curli (*csgA*) e celulose (*bcsA*) foram pesquisados com o emprego de uma PCR *multiplex* padronizada com: solução tampão Go Taq 5X, DNA polimerase Go Taq (Promega), dNTPs (cBIOT), oligonucleotídeos (Tabela 1), água purificada e DNA (40 ng) dos isolados, sendo homogeneizados em um volume total de 25 µL. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 94°C por 3 min; seguidos de 30 ciclos de 94°C/40 seg, 55°C/40 seg, 68°C/40 seg; e mais 10 min de extensão a 68°C. O produto foi visualizado em gel agarose 1 % e corado com brometo de etídeo.

## 2.4 Expressão fenotípica de curli e celulose

Para verificar a expressão do curli, os isolados foram semeados em Ágar LB (Luria-Bertani) sem sal, suplementado com 40 mg/L de Vermelho Congo e 20mg/L de Coomassie Blue. Para a confirmação da produção de celulose os isolados foram semeados em ágar LB (Luria-Bertani) sem sal, suplementado com 200 mg/L de Calcoflúor (*fluorescent brightener* 28, Sigma). Os isolados foram incubados à 28°C por 48h. Após incubação, a produção de celulose foi julgada com base na visualização das colônias sob luz UV (360 nm) (SOLOMON et al., 2005).

Os perfis fenotípicos das colônias analisadas foram determinados conforme Solomon et al. (2005) em: *rdar* (*red, dry and rough* – vermelha, seca e rugosa; expressão de curli e produção de celulose), *pdar* (*pink, dry and rough* – rosa, seca e rugosa; somente produção de celulose), *bdar* (*brown, dry and rough* – marrom, seca e rugosa; somente expressão de curli), e *saw* (*smooth and white* – lisa e branca; sem expressão de curli e de celulose).

## 2.5 Formação de Biofilme

Para avaliar a formação de biofilme *in vitro*, seguiu-se a metodologia descrita por Stepanović et al. (2000) em que cada isolado foi inicialmente submetido à diluição de até 10<sup>6</sup> UFC/mL (escala 0,5 de MacFarland) em caldo Luria-Bertani (LB) (Difco™). Quatro alíquotas de 200 µL do caldo LB com cada isolado foram semeadas em quatro poços em

microplaca de poliestireno de 96 poços com fundo chato (Nest®). As microplacas foram incubadas por 96 horas a 35°C, lavadas três vezes com solução salina tamponada PBS (pH 7,2) e coradas com cristal violeta 1% por 15 minutos. Após, foram lavadas novamente com água destilada, secadas em temperatura ambiente e medida a absorvância em 540 nm (SpectraMax M5, Molecular Devices). A capacidade de formação de biofilme foi aferida pela comparação das médias das absorvâncias das cepas com a média das absorvâncias do branco e aplicação de análise estatística para verificação da diferença significativa entre elas.

## 2.6 Teste *in vitro* de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) *in vitro* foi conduzido utilizando a técnica de difusão com discos e interpretado como recomendado pelo guia *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Quinze antimicrobianos de sete classes foram testados: (i) Beta-lactâmicos: ampicilina (AMP; 10µg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC; 20µg/10µg), ceftiofur (CTF; 30µg) e cefepime (CPM; 30µg); (ii) Aminoglicosídeos: gentamicina (GEN; 10µg), neomicina (NEO; 30µg), estreptomicina (EST; 10µg) e ampicacina (AMI; 30µg); (iii) Fluoroquinolonas: enrofloxacina (ENO; 5µg), ciprofloxacina (CIP; 5µg) e ácido nalidíxico (NAL; 30µg), (iv) Tetraciclina: tetraciclina (TET; 30µg); (v) Sulfonamidas: sulfonamida (SUL; 300µg) e sulfametoxazol/trimetoprim (SUT; 25µg) e (vi) Anfenicóis: florfenicol (FLF; 30µg) (Laborclin®, Pinhais, PR, Brasil). Como controle de qualidade para os testes foi utilizada *E. coli* ATCC 25922.

Isolados multirresistentes foram definidos como aqueles resistentes a pelo menos três classes de antimicrobianos (BRYAN et al., 2010) para posterior comparação com o Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA) de cada isolado.

O IRMA foi calculado com base no método descrito por Krumperman (1983). A mesma equação proposta pelo autor foi adaptada para a avaliação dos isolados diante das classes de antimicrobianos utilizados.

## 2.7 Análise Estatística

A capacidade de formação de biofilme foi aferida pela comparação das médias das absorvâncias das cepas com a absorvância do branco e aplicação de análise estatística para verificação da diferença significativa entre elas. Para isso foi utilizada a análise de variância *one-way* ANOVA com o teste Tukey, sendo  $P < 0,05$  usado como critério de significância estatística.

Para avaliar o Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA) dos isolados de bezerros saudáveis e diarreicos foi utilizado o teste do qui-quadrado. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS, versão 9.4 (SAS, 2012).

### 3. Resultados

#### 3.1 Grupos filogenéticos

Os isolados de *E. coli* de bezerros sem diarreia foram classificados em sua maioria no grupo B1 (83,3%; 25/30) e grupo E (10%; 3/30). Apenas dois isolados foram caracterizados como desconhecidos (6,7%; 2/30).

Os isolados recuperados de bezerros com diarreia foram classificados nos seguintes filo-grupos: grupo B1 (70%; 21/30), grupo B2 (3,33%; 1/30), grupo C (3,33%; 1/30), grupo D (3,33%; 1/30) e grupo E (13,33%; 4/30). Dois isolados dessa categoria foram considerados desconhecidos (6,7%; 2/30).

#### 3.2 Fatores de virulência

##### 3.2.1 Fímbrias e toxinas

Nos isolados de bezerros sem diarreia não foi detectada a presença de genes para fímbrias, enquanto que 30% (9/30) dos isolados de bezerros diarreicos foram positivos para esse fator de virulência, sendo 16,7 % (5/30) para F5 e 13,3% (4/30) para F18.

Uma inversão deste padrão foi observada quanto à presença de genes que codificam para a produção de toxinas: 28 isolados de animais sem diarreia (93,3%) apresentaram ao menos um gene que codifica para produção de toxinas. A toxina mais encontrada foi STb (66,7%; 20/30) seguida de LT (56,7%; 17/30) e STa (33,3%; 10/30). A toxina STx2 não foi observada nesse grupo. Já dentre os isolados de bezerros diarreicos, a maioria dos isolados não apresentou gene para toxinas (70%; 21/30). Sete (23,3%) isolados foram positivos para LT, um (3,3%) para STa, um (3,3%) para STb e um (3,3%) para STx2.

##### 3.2.2 Curli e celulose

Entre os isolados de bezerros sem diarreia, a maioria (96,7%; 29/30) foi positiva para a presença do gene *csgA* e para o gene *bcsA* (83,3%, 25/30) pela técnica de PCR. Dentre os isolados de bezerros diarreicos, 90% (27/30) foram positivos tanto para *csgA*, quanto para *bcsA*.

### 3.3 Expressão fenotípica de curli e celulose

No grupo dos bezerros sem diarreia, quando da avaliação da expressão fenotípica do curli e celulose, 25 isolados (83,3%) apresentaram o fenótipo *rdar* (expressão de curli e celulose) e cinco (16,7%) o fenótipo *saw* (ausência de expressão de ambos os fatores). Ao passo que, todos os isolados de bezerros com diarreia apresentaram o fenótipo *rdar*.

### 3.4 Formação de biofilmes

Através da análise estatística aplicada às médias das absorbâncias dos isolados e do branco, somente um isolado dos bezerros sem diarreia (3,3%) apresentou formação de biofilme ( $P < 0,05$ ).

### 3.5 Teste *in vitro* de susceptibilidades aos antimicrobianos

Observaram-se diferenças no perfil de susceptibilidade entre os isolados do grupo de bezerros com e sem diarreia. Todos os isolados de bezerros sem diarreia foram sensíveis à maioria dos antimicrobianos (Tabela 2) apresentando resistência apenas à ampicilina (3,3%; 1/30), tetraciclina (6,7%; 2/30) e sulfonamida (6,7%; 2/30). Os isolados de bezerros com diarreia, apresentaram perfil intermediário para a susceptibilidade menor do que os isolados de animais sem diarreia, porém um número muito maior de resistentes à tetraciclina (63,3%; 19/30), ampicilina e estreptomicina (50%, 15/30), sulfonamida (46,7%; 14/30) e sulfazotrim (33,3%; 10/30). A Tabela 2 mostra o perfil de susceptibilidade dos isolados de *E. coli* dos grupos analisados. Ceftiofur, cefepime, gentamicina, amicacina e ciprofloxacina foram os antimicrobianos que obtiveram melhor desempenho, os quais 100% dos isolados de ambos os grupos demonstraram sensibilidade.

Nenhum isolado do grupo dos bezerros sem diarreia foi caracterizado como multirresistente. Já o grupo dos bezerros diarreicos apresentou 16 isolados multirresistentes (53,3%) (resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos) ( $P < 0,0001$ ).

O IRMA da maioria dos isolados de bezerros sem diarreia (83,3%; 25/30) foi zero, tanto para antimicrobianos quanto para às classes. Somente cinco isolados apresentaram resistência a um antimicrobiano e a uma classe (IRMA antimicrobiano= 0,067 e IRMA classe= 0,167). A tabela 3 mostra os valores do IRMA obtido dos isolados do grupo de bezerros diarreicos em relação aos isolados considerados multirresistentes e seus respectivos perfis de resistência.

#### 4. Discussão

Em ambos os grupos de bezerros, o filo-grupo B1 foi majoritariamente observado (83,3% e 70%, respectivamente). Ao compararmos os grupos, observou-se que isolados de bezerros diarreicos apresentaram uma maior diversidade de grupos filogenéticos. Estes resultados são similares a outros estudos utilizando amostras de fezes de bovinos, em que foi observada predominância de isolados de *E. coli* pertencentes ao filo-grupo B1 (HOUSER et al., 2008; SON et al., 2009; COURA et al., 2017).

O filo-grupo E, em ambos os grupos analisados foi o segundo mais frequentemente encontrado (10% - bezerros sem diarreia; 13,33% - bezerros diarreicos). Esse filo-grupo de acordo com CLERMONT et al. (2013) é potencialmente patogênico. Trata-se de um grupo filogenético restrito, constituído de cepas ainda pouco caracterizadas, embora o sorotipo O157:H7 pertença a este grupo filogenético (TENAILLON et al., 2010), de extrema importância para a saúde pública cujo reservatório principal é o bovino (FERENS & HOVDE, 2011).

Os filo-grupos B2, C e D foram encontrados apenas dentre as amostras de animais diarreicos (apenas um isolado cada). Conforme ESCOBAR-PÁRAMO et al. (2004) e CLERMONT et al. (2013), B2 e D são grupos filogenéticos que agrupam cepas com potencial patogênico, sendo mais comumente observados em infecções extraintestinais.

Uma vez que *E. coli* é uma bactéria que pertence a microbiota de humanos e animais, a presença de fatores de virulência são determinantes para a ocorrência de doença (KAPER, et al., 2004; DUBREUIL et al., 2016). Fímbrias (F4, F5, F6, F18 e F41) e toxinas (LT, STa, STb e STx2) estão entre os mais importantes fatores de virulência de ETEC e determinam a ocorrência de diarreias em bezerros (FOSTER & SMITH, 2009).

Nenhum isolado do grupo composto de bezerros sem diarreia foi positivo para fímbrias, ao passo que no constituído de bezerros com diarreia, as fímbrias F5 e F18 foram observadas em 16,7% e 13,3% dos isolados respectivamente. A presença de fímbrias em isolados de *E. coli* de diarreias é um importante indicativo da participação desse micro-organismo nessa condição clínica. Fímbrias são fatores de virulência que possibilitam a colonização de *E. coli* principalmente no intestino delgado, evitando que esta seja eliminada junto com as fezes (DUBREUIL et al., 2016). Esse fato poderia explicar o ocorrido em relação aos isolados do grupo de bezerros sem diarreia, que apresentaram elevada frequência de genes que codificam toxinas, porém sem a presença de fímbrias, importante para colonização intestinal.

As fímbrias F5 e F41 estão entre as mais encontradas em isolados de ETEC de bezerros com diarreia e STa a toxina mais observada (NAGY & FEKETE, 2005; KOLENDA et al., 2009). No presente estudo, F5 também foi a fímbria mais encontrada, porém F18, mais comumente associada a diarreias pós-desmame e doença do edema em suínos (TIELS et al., 2005; DUBREUIL et al., 2016), também foi observada. Somente leitões pós-desmamados apresentam receptores para F18 (NAGY & FEKETE, 2005; TIELS et al., 2005). Já em relação às toxinas, STa foi observada somente em um único isolado do grupo de bezerros diarreicos e em 10 de bezerros sem diarreia (33,3%). A toxina STb foi a que apresentou maior frequência entre os isolados de bezerros sem diarreia (66,7%). Essa toxina é mais comumente observada em isolados de *E. coli* de suínos, porém pode ser observada esporadicamente em isolados de bovinos com sinais de diarreia (DUBREUIL et al., 2016).

A elevada frequência de genes para toxinas nos isolados de bezerros sem diarreia pode estar relacionado à alta densidade microbiana intestinal, que proporciona troca de elementos genéticos constantemente. Sabe-se que *E. coli* comensais podem adquirir facilmente genes de virulência e dessa forma apresentar características diferenciadas de outros isolados (CROXEN & FINLAY, 2010; TENAILLON et al., 2010).

ETEC tem sido implicada como a principal causa de diarreia neonatal em bezerros e induz diarreia principalmente nos primeiros quatro dias de vida, sendo que bezerros mais velhos ou bovinos adultos são mais resistentes. A presença, alteração ou ausência de determinados receptores no muco ou nas microvilosidades intestinais varia com a idade, fato que poderia explicar a colonização intestinal e a diarreia mediada por ETEC dependente da idade (DUBREUIL et al., 2016). Muitas vezes o isolamento de *E. coli* a partir de casos de diarreias em bezerros é um indicativo de provável participação de *E. coli* na enfermidade, porém a ausência de fatores de virulência, pode tornar a causa primária de *E. coli* duvidosa, já que existe a participação de outros agentes como vírus (Coronavírus e Rotavírus) e protozoários (*Cryptosporidium* spp.) (FOSTER & SMITH, 2009; LORENZ et al., 2011).

A microbiota comensal, especialmente a intestinal, tem mostrado grande importância na emergência da resistência antimicrobiana. A alta densidade bacteriana no intestino, com uma grande diversidade genética como é o caso de *E. coli*, associada à elevada exposição aos antimicrobianos, em virtude do seu uso excessivo na medicina veterinária, são fatores cruciais na seleção de micro-organismos comensais resistentes (KHACHATRYAN et al., 2006; TENAILLON et al., 2010).

Tetraciclina, ampicilina, estreptomicina e sulfonamida estão entre os antimicrobianos mais utilizados na produção animal, com elevada relação ao aparecimento de resistência de



isolados de *E. coli* em diversos países (CHANTZIARAS et al., 2014). O presente trabalho apresenta dados que corroboram com essa relação (Tabelas 3 e 4).

O uso frequente de tetraciclina, uma das classes mais utilizadas em tratamentos de bovinos, pode conferir resistência aos isolados de *E. coli* em decorrência de genes de resistência estarem localizados em plasmídeos, transposons e integrons (SHIN et al., 2015). O presente estudo observou grande resistência dos isolados à tetraciclina (63,3%), resultado semelhante a outros estudos com esse antimicrobiano, frente aos isolados de *E. coli* em bovinos (DE VERDIER et al., 2012; VALAT et al., 2012; SHIN et al., 2015). A transferência horizontal de genes de resistência para tetraciclina é um mecanismo efetivo de disseminação de resistência em populações bacterianas (SHIN et al., 2015), e pode explicar a elevada prevalência de isolados de *E. coli* resistentes.

As elevadas taxas de resistência dos isolados à ampicilina, estreptomicina e sulfonamida, 50%, 50% e 46,7% respectivamente, são concordantes com os resultados apresentados por Khachatryan et al. (2006) e Cheney et al. (2015), uma vez que esses três antimicrobianos são amplamente utilizados na medicina veterinária, tanto em tratamentos quanto de forma profilática na dieta de bovinos, aumentando a pressão seletiva para isolados resistentes a estes fármacos.

Chantziaras et al. (2014) demonstraram através de um extenso estudo envolvendo o uso de antimicrobianos destinados a infecções por *E. coli* em sete países que, à medida que se aumenta a utilização de determinado antimicrobiano, o aparecimento de resistência torna-se maior. Nesse sentido, antimicrobianos como o ceftiofur, cefepime, amicacina e ciprofloxacina, que não estão facilmente disponíveis no mercado brasileiro e/ou não apresentam um custo compatível com a realidade atual, apresentaram desempenho no qual 100% dos isolados foram sensíveis. A única exceção dentre esses antimicrobianos foi a gentamicina, cujo acesso é maior em decorrência do menor custo. A obtenção desse dado, reflete claramente a importância do uso prudente de antimicrobianos, evitando-se o esgotamento de opções antimicrobianas.

A alta frequência dos genes *csgA* e *bcsA* e a constante expressão do curli e da celulose, tanto nos isolados comensais quanto isolados de diarreia, encontrados neste trabalho, mostra a importância destes genes para isolados de *E. coli* de origem intestinal de bovinos. Curli e celulose são os componentes majoritários da matriz extracelular de *E. coli*, e estão altamente associados à capacidade de colonização (SERRA & HENGGE et al., 2014). Porém, utilizando-se a metodologia empregada, não fomos capazes de observar a formação de biofilme nos isolados analisados, com exceção de apenas um isolado de bezerro sem diarreia.

## 5. Conclusões

Neste estudo foi demonstrado que nos isolados de *E. coli*, tanto de animais saudáveis quanto de doentes, o filo-grupo B1 (comensal) foram identificados em maior proporção. Porém, os isolados de animais com diarreia apresentaram fatores de virulência importantes para colonização intestinal (fímbrias), ausentes nos isolados de bezerros saudáveis. Isolados de *E. coli* de animais diarreicos apresentaram multirresistência aos antimicrobianos testados em comparação com isolados de fezes de bezerros saudáveis, com destaque para tetraciclina, ampicilina, estreptomicina e sulfonamida, seguindo uma tendência mundial. Não houve diferenças na expressão de curli e celulose, bem como na formação de biofilme para ambos os grupos de isolados.

## Agradecimentos

Os autores são gratos às agências brasileiras de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul subsídio número 68.902.901.582.806.000.000 (FAPERGS/CAPES 17/2012) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior subsídio número 2734/2011 (PNPD) pelo apoio financeiro. As fontes de financiamento não tinham envolvimento com o trabalho.

## Referências

AL MAWLY, J.; GRINBERG, A.; PRATTLE, D.; MOFFAT, J.; MARSHALL, J.; FRENCH, N. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. **Veterinary Journal**, 2:155-160, 2015.

BOKRANZ, W.; WANG, X.; TSCHÄPE, H.; RÖMLING, U. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. **Journal of Medical Microbiology**, 54:1171–1182, 2005.

BRYAN, J.; LEONARD, N.; FANNING, S.; KATZ, L.; DUGGAN, V. Antimicrobial resistance in commensal faecal *Escherichia coli* of hospitalized horses. **Irish Veterinary Journal**, 63(6):373-379, 2010.

CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B.; DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 69:827-834, 2014.

CHENEY, T. E. A.; SMITH, R. P.; HUTCHINSON, J. P.; BRUNTON, L. A.; PRITCHARD, G.; TEALE, C. J. Cross-sectional survey of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from diseased farm livestock in England and Wales. **Epidemiology and Infection**, 143:2653-2659, 2015.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied and Environmental Microbiology**, 66(10):4555-4558, 2000.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, 5(1):58e65, 2013.

Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Testing for Bacteria Isolated from Animals: Second Informational Supplement VET01-S2, CLSI, Wayne, PA, USA, 2013.

CONSTABLE, P. D. Treatment of Calf Diarrhea: Antimicrobial and Ancillary Treatments. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 25:101–120, 2009.

COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; SPRICIGO, D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS, A. P. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 26(1):5-8, 2006.

COURA, F. M.; DE ARAÚJO DINIZ, S.; MUSSI, J. M.; SILVA, M. X.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. **Folia Microbiologica**, 62(2):139-144, 2017.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews**, 8:26-38, 2010.

DUBREUIL, J. D.; ISAACSON, R. E.; SCHIFFERLI, D. M. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, 7(1), 2016.

ESCOBAR-PÁRAMO, P.; CLERMONT, O.; BLANC-POTARD, A. B.; BUI, H.; LE BOUQUÉNEC, C.; DENAMUR, E. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. **Molecular Biology and Evolution**, 21:1085- 1094, 2004.

FERENS, W. A.; HOVDE, C. J. *Escherichia coli* O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection. **Foodborne Pathogens and Disease**. 8(4): 465-487, 2011.

FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 25:13-16, 2009.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L. Pathogenesis of bacterial infections in animal. 4th ed. Blackwell Publishing, Ames, pp 267-308, 2010.

HOUSER, B. A.; DONALDSON, S. C.; PADTE, R.; SAWANT, A. A.; DEBROY, C.; JAYARAO, B. M. Assessment of Phenotypic and Genotypic Diversity of *Escherichia coli* Shed by Healthy Lactating Dairy Cattle. **Foodborne Pathogens and Disease**, 5(1):41-51, 2008.

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

KOLENDA, R.; BURDUKIEWICZ, M.; SCHIERACK, P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 5: 23, 2015.

KHACHATRYAN, A. R.; BESSER, T. E.; HANCOCK, D. D.; CALL, D. R. Use of a Nonmedicated Dietary Supplement Correlates with Increased Prevalence of Streptomycin-Sulfa-Tetracycline-Resistant *Escherichia coli* on a Dairy Farm. **Applied and Environmental Microbiology**, 72(7):4583-4588, 2006.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. **Applied and Environmental Microbiology**, 46(1):165-170, 1983.

LORENZ, I.; FAGAN, J.; MORE, S. J. Calf health from birth to weaning II. Management of diarrhea in pre-weaned calves. **Irish Veterinary Journal**, 64: 1-9, 2011.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 3 ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2000.

MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology**, 4:608–620, 2006.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, 295:443–454, 2005.

NGUYEN, T. D.; VO, T. T.; VU-KHAC, H. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. **Journal of Veterinary Science**, 12(2):159-164, 2011.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Spain: Wolfe, 1994. 648p.

SALDAÑA, Z.; XICOHTENCATL-CORTES, J.; AVELINO, F.; PHILLIPS, A. D.; KAPER, J. B.; PUENTE, J. L.; GIRÓN, J. A. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. **Environmental Microbiology**, 11(4): 992–1006, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Preparation and analysis of Prokaryotic genomic DNA**. In: Molecular Cloning. 3rd ed. v.1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.6.62, 2001.

SAS Institute. 2012. SAS 9.4 for Windows. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

SERRA, D. O.; HENGGE, R. Stress responses go three-dimensional - the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. **Environmental Microbiology**, 16:1455-1471, 2014.

SHIN, S. W.; SHIN, M. K.; JUNG, M.; BELAYNEHE, K. M.; YOO, H. S. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Transfer of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Beef Cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, 81(16):5560-5566, 2015.

SOLOMON, E. B.; NIEMIRA, B. A.; SAPERS, G. M.; ANNOUS, B. A. Biofilm Formation, Cellulose Production, and Curli Biosynthesis by *Salmonella* Originating from Produce, Animal, and Clinical Sources. **Journal of Food Protection**, 68: 906-912, 2005.

SON, I.; VAN KESSEL, J. A. S.; KARNS, J. S. Genotypic Diversity of *Escherichia coli* in a Dairy Farm. **Foodborne Pathogens and Disease**, 6(7):837-847, 2009.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; SVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, 40:175–179, 2000.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 8:207-217, 2010.

TIELS, P.; VERDONCK, F.; SMET, A.; GODDEERIS, B.; COX, E. The F18 fimbrial adhesin FedF is highly conserved among F18<sup>+</sup> *Escherichia coli* isolates. **Veterinary Microbiology**, 110:277-283, 2005.

TREVISI, E.; ZECCONI, A.; COGROSSI, S.; RAZZUOLI, E.; GROSSI, P.; AMADORI, M. Strategies for reduced antibiotic usage in dairy cattle farms. **Research in Veterinary Science**, 96:229-233, 2014.

VALAT, C.; AUVRAY, F.; FOREST, K.; MÉTAYER, V.; GAY, E.; GARAM, C. P.; MADEC, J.; HAENNI, M. Phylogenetic Grouping and Virulence Potential of Extended-

Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains in Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(13):4677-4682, 2012.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos usados para detectar os genes de curli e celulose em isolados de *E. coli* oriundos de fezes de bezerros saudáveis e diarreicos.

<b>Gene</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Sequencia (5'-3')</b>	<b>Tamanho do amplicon</b>
<i>csgA</i>	curli	sense: GGTTGTTGCGCAAGAAGG antisense: ATATCCCCTTGCTGGGTC	875 bp
<i>bcsA</i>	celulose	sense: GTATTGCTGTCGAAACGGTAACC antisense: CGATATTTGCCCTGGATCTTCGA	412 pb



**Tabela 2.** Perfil de susceptibilidade de isolados de *E. coli* oriundos de bezerros sem (n=30) e com diarreia (n=30) frente a 15 antimicrobianos.

Distribuição dos isolados de acordo o perfil de susceptibilidade						
Antimicrobianos	Sensível		Intermediário		Resistente	
	Sem diarreia	Com diarreia	Sem diarreia	Com diarreia	Sem diarreia	Com diarreia
<b>AMP</b>	7 (23,3%)	14 (46,7%)	22 (73,3%)	1 (3,3%)	1 (3,3%)	15 (50%)
<b>AMC</b>	30 (100%)	29 (96,7%)	--	1 (3,3%)	--	--
<b>CTF</b>	30 (100%)	30 (100%)	--	--	--	--
<b>CPM</b>	30 (100%)	30 (100%)	--	--	--	--
<b>GEN</b>	30 (100%)	30 (100%)	--	--	--	--
<b>NEO</b>	19 (63,3%)	25 (83,3%)	11 (36,7%)	--	--	5 (16,7%)
<b>EST</b>	22 (73,3%)	13 (43,3%)	8 (26,7%)	2 (6,7%)	--	(15) 50%
<b>AMI</b>	30 (100%)	30 (100%)	--	--	--	--
<b>ENO</b>	30 (100%)	27 (90%)	--	2 (6,7%)	--	1 (3,3%)
<b>CIP</b>	30 (100%)	30 (100%)	--	--	--	--
<b>NAL</b>	30 (100%)	22 (73,3%)	--	6 (20%)	--	2 (6,7%)
<b>TET</b>	8 (26,7%)	9 (30%)	20 (66,6%)	2 (6,7%)	2 (6,7%)	19 (63,3%)
<b>SUT</b>	30 (100%)	19 (63,3%)	--	1 (3,3%)	--	10 (33,3%)
<b>SUL</b>	26 (86,6%)	15 (50%)	2 (6,7%)	1 (3,3%)	2 (6,7%)	14 (46,7%)
<b>FLF</b>	29 (96,7%)	30 (100%)	1 (3,3%)	--	--	--

AMP= ampicilina; AMC= amoxicilina/ácido clavulânico; CTF= ceftiofur; CPM= cefepime; GEN= gentamicina; NEO= neomicina; EST= estreptomicina; AMI= amicacina; ENO= enrofloxacina; CIP= ciprofloxacina; NAL= ácido nalidíxico; TET= tetraciclina; SUT= sulfazotrim; SUL= sulfonamida; FLF= florfenicol.

**Tabela 3.** Valor do IRMA atribuído aos isolados de *E. coli* (n=16) considerados multirresistentes ( $p<0,0001$ ) oriundos de bezerros diarreicos, agrupados em perfis de resistência para classes de antimicrobianos.

<b>Perfil de resistência (Classes)</b>	<b>Nº Isolados</b>	<b>IRMA (Antimicrobianos)</b>	<b>IRMA (Classes)</b>
BL / A / T / S	10	0,333*	0,667
BL / A / T	3	0,200	0,500
BL / A / F / T / S	1	0,467	0,833
A / T / S	1	0,267	0,500
BL / T / S	1	0,267	0,500

BL= beta-lactâmicos; A= aminoglicosídeos; T= tetraciclina; S= sulfonamidas; F= fluoroquinolonas.

IRMA: Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos

\*média do IRMA dos isolados

## 7 CAPÍTULO V

### **Grupos filogenéticos, fatores de virulência e perfil de susceptibilidade de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina**

Phylogenetic groups, virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis

Jonas Fernandes Maciel<sup>a</sup>, Agueda Castagna de Vargas<sup>a\*</sup>

(Artigo a ser submetido para publicação)

<sup>a</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 97105-900.

\*Autor para correspondência: Tel.: +55 55 3220 8107; fone/fax: +55 3220 8257. E-mail: agueda.vargas@gmail.com.

## **Grupos filogenéticos, fatores de virulência e perfil de susceptibilidade de *Escherichia coli* isoladas de mastite clínica bovina**

Phylogenetic groups, virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis

### **Resumo**

*Escherichia coli* é o mais importante patógeno causador de mastite bovina de origem ambiental, caracterizado pela complexidade de fatores de virulência e refratariedade ao tratamento. *E. coli* patogênica mamária (MPEC) é um patotipo proposto recentemente, porém ainda sem total entendimento do perfil de genes associados a virulência na mastite bovina. No presente estudo, isolados de *E. coli* de mastite clínica bovina foram submetidos à agrupamento filogenético, pesquisa de fatores de virulência, formação de biofilme e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Entre 50 isolados analisados, 30 foram filo-tipificados nos seguintes grupos: A (50%); B1 (30%); C (6,7%); F (6,7%); B2 (3,3%) e D (3,3%). Nenhum isolado foi positivo para fímbrias (F4, F5, F6, F18 e F41) e toxinas (STa, STb, LT e Stx2). A formação de biofilme *in vitro* foi uma característica pouco observada entre esses isolados (10%), o que denota a importância dos fatores relacionados à glândula mamária para tal processo. Foram observados ainda isolados multirresistentes (24%), com baixa efetividade para tetraciclina (46%) e ampicilina (40%), além da presença de isolados produtores de ESBL (10%).

Palavras-chave: MPEC, mastite bovina, filo-grupos, fatores de virulência, multirresistencia.

### **Abstract**

*Escherichia coli* is the major pathogen of environmental bovine mastitis, characterized by complexity of virulence factors and refractoriness to treatment. Mammary pathogenic *E. coli* (MPEC) is a recently proposed pathotype, but still without full understanding of its genes profile with bovine mastitis. Here, isolates of *E. coli* from bovine mastitis were submitted to phylogenetic clustering, virulence factors screening, biofilm formation capacity and antimicrobial susceptibility profile. Among 50 isolates, 30 were filo-typified as: A (50%); B1 (30%); C (6.7%); F (6.7%); B2 (3.3%) and D (3.3%). No isolates were positive for fimbriae

(F4, F5, F6, F18, and F41) and toxins (STa, STb, LT and Stx2). *In vitro* biofilm formation was a very low characteristic observed among these isolates (10%), which indicates the importance of factors related to the mammary gland for this process. Were observed multiresistant isolates (24%), with low effectiveness to tetracycline (46%) and ampicillin (40%), besides ESBL producers (10%).

Key words: MPEC, bovine mastitis, phylo-groups, virulence factors, multi-drug resistance

## 1. Introdução

*Escherichia coli* pertence a microbiota gastrintestinal de animais de sangue quente e répteis, e pode ser encontrada colonizando diferentes sítios anatômicos e causando infecções entéricas e extraentéricas (TENNAILON et al., 2010). Apresenta capacidade de colonizar a glândula mamária bovina e causar mastite, o que resulta em elevadas perdas econômicas para o setor (HALASA et al., 2007; OLDE RIEKERINK et al., 2008). Na União Europeia, foram estimadas em 2 bilhões de euros/ano (GOLSDTONE et al., 2016).

*E. coli* está comumente associada a ocorrência de mastite clínica grave, de evolução aguda e muitas vezes, não responsiva ao tratamento com antimicrobianos (SCHUKKEN et al., 2011; BLUM et al., 2014). Nestes casos, encontram-se envolvidas cepas de *E. coli* patogênica mamária (MPEC), um novo patotipo proposto para cepas isoladas de mastite bovina. A caracterização deste patotipo tem sido direcionada à filogenia dos isolados, apresentando maior relação com isolados comensais (grupos A e B1). No entanto, não está completamente esclarecido o perfil de virulência de isolados MPEC obtidos de casos de mastite bovina (BLUM & LEITNER, 2013; RICHARDS et al., 2015; GOLDSTONE et al., 2016).

A classificação de *E. coli* em diferentes grupos filogenéticos baseia-se na presença de genes como *chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2* e *arpA* (CLERMONT et al., 2013). Embora a classificação dos isolados possibilite prever o potencial patogênico, poucos estudos têm sido conduzidos enfocando a filogenia de isolados de *E. coli* obtidos de mastite bovina (DOGAN et al., 2006; BLUM et al., 2008). Outro fator importante a ser considerado, especialmente em casos de mastite recorrente, é a formação de biofilme, que auxilia na sobrevivência de isolados de *E. coli* no ambiente extraintestinal, e na resistência às substâncias nocivas às bactérias, como os antimicrobianos (MELCHIOR et al., 2006).

Em decorrência do grande impacto econômico da mastite bovina, o uso de antimicrobianos tanto de forma terapêutica quanto profilática, é realizado muitas vezes de modo indiscriminado (SRINIVASAN et al., 2007), resultando em resistência antimicrobiana

tanto em cepas patogênicas quanto comensais (LANZ et al., 2003). Acredita-se que até 2030 o uso de antimicrobianos na produção animal aumentará em 67%, passando de 63.151 toneladas para 105.596 toneladas (VAN BOECKEL et al., 2015).

A patogenicidade de isolados de *E. coli* pode ser ainda determinada pela presença de fatores de virulência, como fímbrias e toxinas, amplamente associados à capacidade de colonização da bactéria no intestino e deflagração do mecanismo de diarreia (DUBREUIL et al., 2016). Outros fatores, como curli e celulose, atuam na adesão e colonização de *E. coli*, além de formação de biofilme em diferentes nichos (GOPHNA et al., 2002; ZOGAJ et al., 2003; SILVA et al., 2014). No entanto, de acordo com a literatura, a ocorrência desses fatores em isolados MPEC ainda não é totalmente conhecida.

Diante do exposto, se faz necessário a caracterização de isolados de MPEC afim de melhor caracterizar o perfil de isolados de mastite bovina. Para isso, este estudo determinou os grupos filogenéticos, fímbrias, toxinas, curli e celulose, bem como o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de *E. coli* obtidos de mastite clínica bovina.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Isolados de *E. coli* e diagnóstico de mastite bovina**

Foram investigados genotípicamente e fenotipicamente 50 isolados de *E. coli* provenientes de mastite clínica bovina. Desses, 41 eram provenientes de amostras de leite de bovinos oriundos do estado de São Paulo, e outros nove isolados provenientes do estado do Rio Grande do Sul. A mastite clínica foi diagnosticada em vacas que apresentaram alterações no aspecto do leite (grumos, pus, estrias de sangue) no teste da caneca telada de fundo escuro (tamis), manifestações clínicas na glândula mamária, como edema, hipertermia, sensibilidade dolorosa à palpação, nódulos, ou mesmo sinais gerais, como taquicardia/taquipneia, febre e alteração dos movimentos ruminais (RADOSTITS et al., 2007).

### **2.2 Classificação em grupos filogenéticos**

Realizou-se a extração de DNA de todos os isolados pelo método de fervura (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) e os produtos quantificados em espectrofotômetro (Picodrop Microliter UV/Vis, Picodrop, Saffron Walden, Essex, UK). A classificação filogenética foi realizada de acordo com a metodologia descrita por CLERMONT et al. (2013), baseada em PCR *quadruplex* inicial abrangendo os genes *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2 e *arpA*. Em seguida, realizou-se PCR simples direcionada aos grupos filogenéticos C e E, de acordo com os resultados obtidos na PCR *quadruplex*. Essa metodologia possibilita a

classificação de *E. coli* em sete grupos filogenéticos *sensu stricto* (A, B1, B2, C, D, E e F) e em clado I.

## 2.3 Determinação de fatores de virulência

### 2.3.1 Fímbrias e toxinas

Foram realizadas duas PCR *multiplex* para detectar a presença de fímbrias (F4, F5, F6, F18 e F41) e toxinas (STa, STb, LT e Stx2), relacionadas principalmente a isolados de patogenicidade intestinal, de acordo com Costa et al. (2006).

### 2.3.2 Curli e celulose

Os isolados foram submetidos a PCR *multiplex* para detecção dos genes curli (*csgA*) e celulose (*bcsA*), os quais são importantes marcadores moleculares para a formação de biofilme em enterobactérias (ZOGAJ et al., 2003). A técnica de PCR foi padronizada utilizando-se: solução tampão Go Taq 5X, DNA polimerase Go Taq (Promega), dNTPs (cBIOT), oligonucleotídeos, água purificada e DNA (40 ng) dos isolados, sendo homogeneizados em um volume total de 25 µL. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 94°C por 3 min; seguidos de 30 ciclos de 94°C/40 seg, 55°C/40 seg, 68°C/40 seg; e mais 10 min de extensão a 68°C. O produto foi visualizado em gel agarose 1 % e corado com brometo de etídeo. A tabela 1 apresenta as sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes *csgA* e *bcsA*.

## 2.4 Expressão fenotípica de curli e celulose

Para verificar a expressão fenotípica do gene do curli, os isolados de *E. coli* foram semeados em ágar LB (Luria-Bertani) sem sal, suplementado com 40 mg/L de Vermelho Congo e 20mg/L de coomassie blue, de acordo com Solomon et al. (2005). As placas semeadas foram incubadas à 28°C por 48h. Em seguida, determinou-se os perfis fenotípicos das colônias analisadas: *rdar* (*red, dry and rough* – vermelha, seca e rugosa; expressão de curli e produção de celulose), *pdar* (*pink, dry and rough* – rosa, seca e rugosa; somente produção de celulose), *bdar* (*brown, dry and rough* – marrom, seca e rugosa; somente expressão de curli) e *saw* (*smooth and white* – lisa e branca; sem expressão de curli e de celulose).

Para confirmar a produção de celulose, os isolados de *E. coli* foram semeados em ágar LB sem sal, suplementado com 200 mg/L de calcoflúor (*fluorescent brightener 28*, Sigma F35543), e incubados à temperatura ambiente por 48h. Após incubação, a produção de

celulose foi avaliada mediante visualização das colônias sob luz UV (360 nm) (SOLOMON et al., 2005). Os isolados que apresentaram fluorescência foram considerados produtores de celulose.

## 2.5 Formação de biofilme

A técnica para análise da formação de biofilme foi realizada conforme Stepanović et al. (2000), com modificações. Colônias dos isolados de *E. coli* foram inoculadas em 4 mL de caldo LB até turvação a 0.5 MacFarland. Após esta etapa, quatro alíquotas de 200 µL do LB de cada isolado foram inoculadas em quatro poços em placas de microdiluição. As placas foram incubadas a 35°C por 96 h. Após este período, o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente e este foi submetido a três lavagens com PBS 1x estéril (pH 7,2) para remoção de células livres (planctônicas). As placas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem, onde as células aderidas foram então coradas com cristal violeta a 1%. Após 15 minutos da aplicação do corante, os poços foram novamente lavados, como descrito anteriormente, e submetidos à secagem em temperatura ambiente. Em cada placa utilizou-se um poço contendo somente LB como controle negativo. A leitura foi realizada por espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) em 540 nm.

A capacidade de formação do biofilme foi aferida por da comparação das médias aritméticas das absorbâncias dos isolados com a média da absorbância do controle negativo e verificação de diferença estatística entre elas.

## 2.6 Teste *in vitro* de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste *in vitro* de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi realizado pelo método de difusão com discos conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Doze agentes antimicrobianos (Laborclin® Pinhais, PR, Brasil) de cinco diferentes classes foram testados: (1) Beta-lactâmicos: ampicilina (AMP; 10µg) e amoxicilina/ácido clavulânico (AMC; 20µg/10µg), cefalotina (CFL; 30µg), ceftiofur (CTF; 30µg) e cefepime (CPM; 30µg); (2) Aminoglicosídeos: gentamicina (GEN; 10µg), neomicina (NEO; 30µg) e estreptomicina (EST; 10µg); (3) Fluoroquinolonas: enrofloxacino (ENO; 5µg) e ciprofloxacino (CIP; 5µg); (4) Tetraciclinas: tetraciclina (TET; 30µg) e (5) Sulfonamidas: sulfametoxazol e trimetoprim (SUT; 25µg). Os isolados foram considerados multirresistentes quando apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (BRYAN et al., 2010). *E. coli* ATCC 25922 foi usada como cepa controle do teste (CLSI, 2013).



A partir dos resultados de TSA, calculou-se o Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA), proposto por Krumperman (1983), bem como o IRMA em relação às classes utilizadas.

## 2.7 Análise da Produção de Beta-Lactamases de Espectro Estendido

A produção de Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL) foi investigada pelo teste de duplo disco difusão. Foi utilizado um disco central contendo amoxicilina/ácido clavulânico (AMC; 20/10µg) e outros três discos dispostos a uma distância de 20 mm do disco central: ceftazidima (CAZ; 30 µg), cefotaxima (CTX; 30 µg) e aztreonam (ATM; 30 µg).

Os isolados foram considerados positivos para ESBL quando houve aumento da zona de inibição (“zona fantasma”) em torno de qualquer uma das cefalosporinas em direção ao disco central com AMX/AC, e quando a zona de inibição ao redor de CAZ, CTX e ATM foi menor ou igual a 22 mm, 27 mm e 27 mm, respectivamente (CLSI, 2013), quando testados individualmente.

## 2.8 Análise estatística

A resistência dos isolados de *E. coli* diante dos antimicrobianos testados foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis. Quando identificadas diferenças entre antimicrobianos, aplicou-se o teste de Bonferroni para a comparação das médias. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS (versão 9.4).

Para avaliar o IRMA diante dos antimicrobianos e suas respectivas classes os mesmos foram separados em multirresistentes ou não e comparados pelo teste do qui-quadrado (SAS, Versão 9.4, 2012).

A capacidade de formação de biofilme foi aferida pela comparação das médias das absorbâncias dos isolados com a absorbância do branco e aplicação de análise estatística para verificação de diferença significativa. Para tanto foi utilizada a análise de variância *one-way* ANOVA com o teste Tukey, sendo  $P < 0,05$  como critério de significância estatística.

## 3. Resultados

### 3.1 Grupos filogenéticos

Do total de 50 isolados, 30 foram classificados em filo-grupos: Grupo A (n= 15/50; 30%), grupo B1 (n= 9/50; 18%), grupo B2 (n= 1/50; 2%), grupo C (n= 2/50; 4%), grupo D (n= 1/50; 2%) e grupo F (n= 2/50; 4%). Os 20 isolados restantes foram classificados em desconhecidos (n= 19/50; 38%) e Clado I (n= 1/50; 2%), conforme Tabela 2. Dos isolados

classificados em grupos filogenéticos conhecidos, 50% (n= 15/30) pertenceram ao filo-grupo A, 30% (n= 9/30) ao filo-grupo B1, 6,7% (n= 2/30) aos filo-grupos C e F e 3,3% (n= 1/30) aos filo-grupos B2 e D.

### 3.2 Presença de genes codificadores de fimbrias, toxinas, curli e celulose

Todos os isolados foram negativos para a presença de genes codificadores das fimbrias F4, F5, F6, F18 e F41 e das toxinas STa, STb, LT e Stx2. Na detecção de curli e celulose, 48% (n=24/50) dos isolados foram positivos para o gene do curli, 34% (n=17/50) para o gene da celulose e 18% (n=9/50) para ambos, estando estes distribuídos em diferentes grupos filogenéticos (Tabela 2).

### 3.3 Formação de biofilme

A formação de biofilme foi observada em 10% (n= 5/50) dos isolados. Considerando a análise de expressão do curli, todos os isolados (isolados 1, 13, 23, 26 e 41) formadores de biofilme, foram positivos para os fenótipos *rdar* e *bdar*. Quanto ao grupo filogenético, estes isolados foram classificados em B1, A, F, A e desconhecido, respectivamente (Tabela 2).

### 3.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

A maior efetividade *in vitro* dos antimicrobianos diante dos 50 isolados de *E. coli* foi verificada para neomicina (50/50= 100%), ciprofloxacina (49/50= 98%), cefepime (48/50= 96%), gentamicina (48/50= 96%), enrofloxacina (46/50= 92%), sulfazotrim (46/50= 92%) e ceftiofur (45/50= 90%). Em contraste, a maior resistência dos isolados foi observada para tetraciclina (23/50= 46%) e ampicilina (20/50= 40%) (Tabela 3).

Foi observada multirresistência a três ou mais classes de antimicrobianos em 24% (n= 12/50) dos isolados. Em relação aos isolados produtores de ESBL, o percentual observado foi de 10% (n= 5/50).

Foi estabelecido o IRMA para cada isolado tanto em relação aos antimicrobianos individualmente quanto em relação às classes de antimicrobianos testadas. Ao verificar os valores de IRMA dos isolados multirresistentes, verificou-se ponto de corte de 0,250. Ao considerar as classes de antimicrobianos, o valor mínimo do IRMA para que um isolado fosse observado como multirresistente era  $\geq 0,500$  (Tabela 4).

#### 4. Discussão

No presente estudo, entre os 50 isolados analisados, 30 foram classificados em grupos filogenéticos conhecidos. Destes, 80% (24/30) foram classificados nos filo-grupos comensais A e B1 (50% e 30%, respectivamente), corroborando com estudos anteriores (SHPIGEL et al., 2008; SUOJALA et al., 2011; DOGAN et al., 2012; BLUM & LEITNER, 2013; LIU et al., 2014; MÜŞTAK et al., 2015; KEMPF et al., 2016). Foi observado que 38% dos isolados (19/50) foram considerados desconhecidos. Essa taxa é considerada elevada em relação aos estudos anteriores, podendo ser creditada ao método de classificação filogenética utilizado. Estudos anteriores a 2013, e mesmo estudos recentes, utilizam a metodologia descrita em CLERMONT et al. (2000), que limita a classificação dos isolados de *E. coli* a apenas quatro grupos filogenéticos. Com o emprego da nova metodologia proposta por CLERMONT et al. (2013), outros grupos podem ser analisados (C, E, F e Clado I), além da observação de isolados desconhecidos, possibilitando uma classificação mais apurada.

Além da classificação em grupos filogenéticos (CLERMONT et al., 2000; 2013) a presença de fatores de virulência em isolados MPEC tem sido pesquisada (FERNANDES et al., 2011; SUOJALA et al., 2011; DOGAN et al., 2012; BLUM & LEITNER, 2013). Estudos anteriores demonstram que isolados MPEC possuem um perfil predominantemente negativo para genes de fímbrias (F4, F5, F6, F18 e F41) e toxinas (STa, STb, LT e Stx2), classicamente associados a *E. coli* de origem intestinal. Nossos resultados concordam com estes achados, uma vez que 100% dos isolados estudados foram negativos para os genes avaliados. Além de não apresentarem perfil compatível com isolados intestinais, MPECs também não apresentariam perfil clássico de isolados extraintestinais (WENZ et al., 2006; RICHARDS et al., 2015; GOLDSTONE et al., 2016; KEANE, 2016; KEMPF et al., 2016). Dentre os fatores de virulência aparentemente conservados em MPEC, o SST6 (sistema de secreção tipo VI) e o lfpA (*long polar fimbriae*) aparentemente são frequentes nas infecções mamárias em vacas (DOGAN et al., 2012; RICHARDS et al., 2015; GOLDSTONE et al., 2016).

Embora os isolados analisados neste estudo sejam provenientes de casos de mastite clínica, aproximadamente 50% destes pertencem a filo-grupos comensais e negativos para fímbrias e toxinas, características comumente observadas em isolados não patogênicos de origem intestinal. Estes achados podem ser explicados, em parte, pela falta de relação entre patotipo/potencial patogênico dos isolados e gravidade da infecção no úbere bovino (PORCHERIE et al., 2012; LEHTOLAINEN et al., 2004), uma vez que a simples presença de *E. coli* pode ser nociva à glândula mamária bovina (YANG et al., 2008). A colonização e consequente gravidade da infecção por MPEC estão também associadas a características do

hospedeiro, como o *status* fisiológico do animal, principalmente a presença de neutrófilos na glândula mamária (BURVENICH et al., 2003).

A formação de biofilme por isolados MPEC pode aumentar a capacidade de adesão, colonização e persistência destes isolados na cisterna do teto e tecido mamário, favorecendo ainda a evasão de células do sistema imune, aumento da inflamação e severidade de sinais clínicos (DYER et al., 2007). A produção de matriz extracelular, fundamental para ocorrência de biofilme, está associada à expressão de curli e celulose e é controlada pelo gene regulador *csgD* (SOLDAÑA et al., 2009; OGASAWARA et al., 2011). Diferentes mecanismos podem ativar positivamente *csgD* *in vivo* e *in vitro*, além de fatores presentes na glândula mamária bovina (DYER et al., 2007), como temperatura, ambiente microaerófilo, limitação de nutrientes e alterações de pH (BARNHART & CHAPMAN, 2006). Neste estudo, embora 48% (24/50) e 34% (17/50) dos isolados sejam positivos para os genes curli e celulose, respectivamente, e sua expressão fenotípica tenha sido identificada (fenótipos *bdar*, *rdar* e *pdar*), apenas 10% (5/50) dos isolados formaram biofilme *in vitro*. Esse fato sugere que outros genes podem ser necessários para formação de biofilme por *E. coli* na glândula mamária em vacas, o que a expressão deste fenótipo pode estar silenciada nos isolados analisados. Sabe-se que a indução da formação de biofilme é influenciada por componentes do leite, como presença de Alpha- e  $\beta$ -caseína, entre outros fatores presentes durante a infecção *in vivo* (VARHIMO et al., 2011). Desta forma, destacamos que os isolados analisados podem apresentar-se como formadores de biofilme em condições diferentes das pesquisadas neste trabalho. Além disso, para Shpigel et al. (2008), a formação *in vitro* de biofilme em isolados de *E. coli* obtidos de mastite bovina não está completamente elucidado na patogênese dessa enfermidade, devido a variabilidade de resultados.

Doze isolados foram considerados multirresistentes, considerando-se a resistência à pelo menos três classes de antimicrobianos (BRYAN et al., 2010). Esses isolados apresentaram valores de IRMA  $\geq 0,250$  (Tabela 4), em consonância com Krumperman (1983), que atribuiu este como valor mínimo para que um isolado bacteriano fosse caracterizado como multirresistente e com alto risco de transmissão cruzada. Ainda, é importante salientar que todas as *E. coli* multirresistentes foram isoladas recentemente (entre 2014 e 2015), bem como cinco isolados produtores de ESBL (10%; 5/50), sugerindo a possibilidade de seleção de genes de resistência ao longo dos anos, comumente observado em *E. coli* (MIRZAAGHA et al., 2011).

Dentre os antimicrobianos que apresentaram menor eficácia estão a tetraciclina (46%; 23/50) e a ampicilina (40%; 20/50). Tal resultado poderia ser justificado, em parte, pelo uso

das tetraciclina e derivados  $\beta$ -lactâmicos há mais de 40 anos no tratamento da mastite bovina, fato que poderia aumentar a pressão seletiva para isolados multirresistentes (MIRZAAGHA et al., 2011; DE VERDIER et al., 2012; CHANTZIARAS et al., 2014; FAIRBROTHER et al. 2015; KEANE et al, 2016; NAVAJAS-BENITO et al., 2017). Souza et al. (2015) realizaram estudo das classes e princípios ativos de antimicrobianos disponíveis no mercado brasileiro com indicação na bula para tratamento de mastite bovina e verificaram 9 classes de antimicrobianos com 31 princípios ativos, dos quais 44,5% pertenciam a classe dos beta-lactâmicos, dos aminoglicosídeos e associação entre estas classes. Observaram também que o perfil de suscetibilidade dos isolados de mastite é relacionado com a origem da amostra e com os antimicrobianos utilizados para o tratamento dos casos clínicos. Apesar da importância destes dados, no presente estudo não se obteve estas informações.

Em contrapartida, 100% dos isolados foram sensíveis à neomicina e mais de 90% de sensibilidade foi observada frente à ceftiofur, cefepime, gentamicina, enrofloxacina, ciprofloxacina e sulfazotrim. Estes resultados de sensibilidade para neomicina, ceftiofur, gentamicina, enrofloxacina, ciprofloxacina e sulfazotrim são semelhantes aos encontrados por Ribeiro et al. (2006) em isolados de *E. coli* de mastite bovina no Brasil.

Os antimicrobianos recomendados para aplicação durante a lactação para tratamento de casos de mastite clínica, conforme Souza et al. (2015), correspondem à 59% (n=106) dos disponíveis no mercado. Ainda, destes produtos para aplicação durante a lactação, 39,2% são para uso intramamário e 60,8% para uso sistêmico.

A emergência da multirresistência bacteriana é uma preocupação de ordem global para os profissionais de saúde, incluído no novo conceito *One Health*. O uso indevido ou não racional dos antimicrobianos, no tratamento ou profilaxia (vaca seca) da mastite, provavelmente tem contribuído para o aumento da resistência em micro-organismos isolados da glândula mamária de vacas. A elevada resistência bacteriana para fármacos de uso comum no tratamento/profilaxia da mastite bovina observado no presente estudo reforça a importância de instituir os tratamentos com base no perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* (LANZ et al., 2003; MIRZAAGHA et al., 2011; WYRSCH et al., 2016).

## 5. Conclusões

O presente estudo caracterizou isolados de MPEC como pertencentes aos grupos filogenéticos comensais (A e B1) em sua maioria, sem relação com isolados enterotoxigênicos. A formação de biofilme *in vitro* foi observada em baixa frequência entre os isolados, o que denota a importância dos fatores relacionados à glândula mamária para tal

processo. Alguns isolados foram caracterizados como multirresistentes e produtores de ESBL, havendo taxas maiores de resistência para fármacos de uso comum, alertando para a importância do uso de antimicrobianos baseado no perfil de sensibilidade microbiana *in vitro*.

### **Agradecimentos**

Os autores são gratos às agências brasileiras de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul subsídio número 68.902.901.582.806.000.000 (FAPERGS/CAPES 17/2012) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior subsídio número 2734/2011 (PNPD) pelo apoio financeiro. As fontes de financiamento não tinham envolvimento com o trabalho.

### **Referências**

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

BLUM S.; HELLER, E. D.; KRIFUCKS, O.; SELA, S.; HAMMER-MUNZ, O.; LEITNER, G. Identification of a bovine mastitis *Escherichia coli* subset. **Veterinary Microbiology**, 132:135e48, 2008.

BLUM, S. E.; LEITNER, G. Genotyping and virulence factors assessment of bovine mastitis *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, 163:305–312, 2013.

BLUM, S. E.; HELLER, E. D.; LEITNER, G. Long term effects of *Escherichia coli* mastitis. **The Veterinary Journal**, 201(1):72–77, 2014.

BRYAN, J.; LEONARD, N.; FANNING, S.; KATZ, L.; DUGGAN, V. Antimicrobial resistance in commensal faecal *Escherichia coli* of hospitalized horses. **Irish Veterinary Journal**, 63(6):373-379, 2010.

BURVENICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, J.; DIEZ-FRAILE, A.; DUCHATEAU, L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Veterinary Research**, 34:521–564, 2003.

CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B.; DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 69:827-834, 2014.

Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Testing for Bacteria Isolated from Animals: Second Informational Supplement VET01-S2, CLSI, Wayne, PA, USA, 2013.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied and Environmental Microbiology**, 66(10):4555-4558, 2000.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, 5(1):58e65, 2013.

COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; SPRICIGO, D. A.; WITT, N. M.; MARCHIORO, S. B.; KOLLING, L.; VARGAS, A. P. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 26(1):5-8, 2006.

DE VERDIER, K.; NYMAN, A.; GREKO C.; BENGTSSON, B. Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 54:2, 2012.

DOGAN, B.; KLAESSIG, S.; RISHNIW, M.; OLIVER, S.; SIMPSON, K.; SCHUKKEN, Y. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 116:270e82, 2006.

DOGAN, B.; RISHNIW, M.; BRUANT, G.; HAREL, J.; SCHUKKEN, Y. H.; SIMPSON, K. W. Phylogroup and *lpfA* influence epithelial invasion by mastitis associated *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, 159:163–170, 2012.

DUBREUIL, J. D.; ISAACSON, R. E.; SCHIFFERLI, D. M. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, 7(1), 2016.

DYER, J. G.; SRIRANGANATHAN, N.; NICKERSON, S. C.; ELVINGER, F. Curli Production and Genetic Relationships Among *Escherichia coli* from Cases of Bovine Mastitis. **Journal of Dairy Science**, 90:193–201, 2007.

FAIRBROTHER, J.; DUFOUR, S.; FAIRBROTHER, J. M.; FRANCOZ, D.; NADEAU, E.; MESSIER, S. Characterization of persistent and transient *Escherichia coli* isolates recovered from clinical mastitis episodes in dairy cows. **Veterinary Microbiology**, 176:126-133, 2015.

FERNANDES, J. B. C.; ZANARDO, L. G.; GALVÃO, N. N.; CARVALHO, I. A.; NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. S. *Escherichia coli* from clinical mastitis: serotypes and virulence factors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 23(6):1146-1152, 2011.

GOLDSTONE, R. J.; HARRIS, S.; SMITH, D. G. E. Genomic content typifying a prevalent clade of bovine mastitis associated *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, 6:30115, 2016.

GOPHNA, U.; OELSCHLAEGER, T. A.; HACKER, J.; RON, E. Z. Role of fibronectin in curli-mediated internalization. **FEMS Microbiology Letters**, 212:55–58, 2002.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; OSTERAS, O.; HOGEVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. **The Veterinary Quarterly**. 29:18- 31, 2007.

KEANE, O. M. Genetic diversity, the virulence gene profile and antimicrobial resistance of clinical mastitis-associated *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, 167:678-684, 2016.

KEMPF, F.; SLUGOCKI, C.; BLUM, S. E.; LEITNER, G.; GERMON, P. Genomic Comparative Study of Bovine Mastitis *Escherichia coli*. **Plos One**, 11(1):e0147954, 2016.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. **Applied and Environmental Microbiology**, 46(1):165-170, 1983.



LANZ, R.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, 91:73–84, 2003.

LEHTOLAINEN, T.; RØNTVED, C.; PYÖRÄLÄ, S. Serum amyloid A and TNF-alpha in serum and milk during experimental endotoxin mastitis. **Veterinary Research**, 35:651–659, 2004.

LIU, Y.; LIU, G.; LIU, W.; LIU, Y.; ALI, T.; CHEN, W.; YIN, J.; HAN, B. Phylogenetic group, virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* associated with bovine mastitis. **Research in Microbiology**, 165:273–277, 2014.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **The Veterinary Journal**, 171:398-407, 2006.

MIRZAAGHA, P.; LOUIE, M.; SHARMA, R.; YANKE, L. J.; TOPP, E.; McALLISTER, T. A. Distribution and characterization of ampicillin and tetracycline-resistant *Escherichia coli* from feedlot cattle fed subtherapeutic antimicrobials. **BMC Microbiology**, 11:78, 2011.

MÜŞTAK, H. K.; GÜNAYDIN, E.; KAYA, İ. B.; SALAR, M. Ö.; BABACAN, O.; ÖNAT, K.; ATA, Z.; DIKER, K. S. Phylo-typing of clinical *Escherichia coli* isolates originating from bovine mastitis and canine pyometra and urinary tract infection by means of quadruplex PCR. **The Veterinary Quarterly**, 34(5):194-199, 2015.

NAVAJAS-BENITO, E. V.; ALONSO, C. A.; SANZ, S.; OLARTE, C.; MARTÍNEZ-OLARTE, R.; HIDALGO-SANZ, S.; SOMALO, S.; TORRES, C. Molecular characterization of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains from a dairy cattle farm and its surroundings, **Science of Food and Agriculture**, 97: 362–365, 2017.

OGASAWARA, H.; YAMAMOTO, K.; ISHISHAMA, A. Role of the Biofilm Master Regulator *CsgD* in Cross-Regulation between Biofilm Formation and Flagellar Synthesis. **Journal of Bacteriology**, 193(10): 2587–2597, 2011.

OLDE RIEKERINK, R.G.M.; BARKEMA, H.W.; KELTON, D.F.; SCHOLL, D.T. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, 91:1366–1377, 2008.

PORCHERIE, A.; CUNHA, P.; TROTÉREAU, A.; ROUSSEL, P.; GILBERT, F. B.; RAINARD, P.; GERMON, P. Repertoire of *Escherichia coli* agonists sensed by innate immunity receptors of the bovine udder and mammary epithelial cells. **Veterinary Research**, 43(1):14, 2012.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. (Eds). **Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10.ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 673-762.

RIBEIRO, M. G.; COSTA, E. O. LEITE, D. S.; LANGONI, H.; GARINO JÚNIOR, F.; VICTÓRIA, C.; LISTONI, F. J. P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58(5):724-731, 2006.

RICHARDS, V. P.; LEFÉBURE, T.; BITAR, P. D. P.; DOGAN, B.; SIMPSON, K. W.; SCHUKKEN, Y. H.; STANHOPE, M. J. Genome Based Phylogeny and Comparative Genomic Analysis of Intra-Mammary Pathogenic *Escherichia coli*. **Plos One**, 10(3):e0119799, 2015.

SALDAÑA, Z.; XICOHTENCATL-CORTES, J.; AVELINO, F.; PHILLIPS, A. D.; KAPER, J. B.; PUENTE, J. L.; GIRÓN, J. A. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of *Fis* as a negative regulator of curli. **Environmental Microbiology**, 11(4): 992–1006, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Preparation and analysis of Prokaryotic genomic DNA**. In: Molecular Cloning. 3rd ed. v.1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.6.62, 2001.

SAS Institute. 2012. SAS 9.4 for Windows. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

SCHUKKEN, Y. H.; GUNTHER, J.; FITZPATRICK, J.; FONTAINE, M. C.; GOETZE, L.; HOLST, O. et al. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 144:270-289, 2011.

SHPIGEL, N.Y.; ELAZAR, S.; ROSENSHINE, I. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. **Current Opinion in Microbiology**, 11(1):60–5, 2008.

SILVA, V. O.; SOARES, L. O.; SILVA JÚNIOR, A.; MANTOVANI, H. C.; CHANG, Y.; MOREIRA, M. A. S. Biofilm Formation on Biotic and Abiotic Surfaces in the Presence of Antimicrobials by *Escherichia coli* Isolates from Cases of Bovine Mastitis. **Applied and Environmental Microbiology**, 80:6136-6145, 2014.

SOLOMON, E. B.; NIEMIRA, B. A.; SAPERS, G. M.; ANNOUS, B. A. Biofilm Formation, Cellulose Production, and Curli Biosynthesis by *Salmonella* Originating from Produce, Animal, and Clinical Sources. **Journal of Food Protection**, 68(5):906-912, 2005.

SOUZA, G. N.; SILVA, M. R.; BRANDÃO, H. M.; GERN, J. C.; GUIMARÃES, A. S.; BARBOSA, L. A.; PEREIRA, O. A. N.; ROCHA, W. J. Avaliação de informações técnicas contidas nas bulas dos antimicrobianos indicados para mastite bovina como método auxiliar na definição de protocolos de tratamento. Embrapa Gado de Leite, 8p., 2015. (Embrapa Gado de Leite, Circular Técnica 108).

SRINIVASAN, V.; GILLESPIE, B. E.; LEWIS, M. J.; NGUYEN, L. T.; HEADRICK, S. I.; SCHUKKEN, Y. H.; OLIVER, S. P. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, 124:319-328, 2007.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; SVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, 40:175–179, 2000.

SUOJALA, L.; POHJANVIRTA, T.; SIMOJOKI, H.; MYLLYNIEMI, A. L.; PITKÄLÄ, A.; PELKONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility

of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 147:383–388, 2011.

TENNAILON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 8:207-217, 2010.

VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; ROBINSON, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 112:5649-5654, 2015.

VARHIMO, E.; VARMANEN, P.; FALLARERO, A.; SKOGMAN, M.; PYÖRÄLÄ, S.; LIVANAINEN, A.; SUKURA, A.; VUORELA, P.; SAVIJOKI, K. Alpha- and  $\beta$ -casein components of host milk induce biofilm formation in the mastitis bacterium *Streptococcus uberis*. **Veterinary Microbiology**, 149:381–389, 2011.

YANG, W.; ZERBE, H.; PETZL, W.; BRUNNER, R. M.; GUNTHER, J.; DRAING, C.; von AULOCK, S.; SCHUBERTH, H. J.; SEYFERT, H. M. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. **Molecular Immunology**, 45(5):1385–1397, 2008.

WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F. B.; ELLIS, R. P.; MAGNUSON, R. J. *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. **Journal of Dairy Science**, 89:3408-3412, 2006.

WYRSCH, E. R.; CHOWDHURY, P. R.; CHAPMAN, T. A.; CHARLES, I. G.; HAMMOND, J. M.; DJORDJEVIC, S. P. Genomic Microbial Epidemiology Is Needed to Comprehend the Global Problem of Antibiotic Resistance and to Improve Pathogen Diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, 7:843, 2016.

ZOGAJ, X.; BOKRANZ, W.; NIMTZ, M.; RÖMLING, U. Production of Cellulose and Curli Fimbriae by Members of the Family *Enterobacteriaceae* Isolated from the Human Gastrointestinal Tract. **Infection and Immunity**, 71(7):4151-4158, 2003.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos usados para detectar os genes curli (*csgA*) e celulose (*bcsA*) em isolados de *E. coli* obtidos de casos de mastite bovina.

<b>Gene</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Sequencia (5'-3')</b>	<b>Tamanho do amplicon</b>
<i>csgA</i>	Curli	sense: GGTTGTTGCGCAAGAAGG antisense: ATATCCCCTTGCTGGGTC	875 bp
<i>bcsA</i>	celulose	sense: GTATTGCTGTCGAAACGGTAACC antisense: CGATATTTGCCCTGGATCTTCGA	412 pb

**Tabela 2.** Distribuição dos grupos filogenéticos, segundo diferentes fatores de virulência (FV), entre os 50 isolados de *E. coli* de mastite bovina.

FV	Grupos filogenéticos							
	Grupo A (n=15)	Grupo B1 (n=9)	Grupo B2 (n=1)	Grupo C (n=2)	Grupo D (n=1)	Grupo F (n=2)	Desconhecido (n=19)	Clado I ou II (n=1)
<b>Curli**</b>	8 (53,3%)	5 (55,5%)	1 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	1 (50%)	6 (31,6%)	--
<b>Celulose**</b>	6 (40%)	4 (44,4%)	1 (100%)	--	1 (100%)	2 (100%)	3 (15,8%)	--
<b>Biofilme</b>	2 (13,3%)*	1 (11,1%)*	--	--	--	1 (50%)*	1 (5,3%)*	--
<b>RMA</b>	2 (13,3%)	1 (11,1%)	--	--	--	2 (100%)	6 (31,6%)	1 (100%)
<b>ESBL</b>	1 (6,7%)	2 (22,2%)	--	--	1 (100%)	1 (50%)	--	--

RMA: Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (isolados resistentes a pelo menos três classes de antimicrobianos); ESBL: Beta-Lactamases de Espectro Estendido; \**One-way* ANOVA –  $P < 0.05$ ; \*\*Presença dos genes por PCR

**Tabela 3.** Perfil de susceptibilidade de 50 isolados de *E. coli* oriundos de mastite bovina a diferentes antimicrobianos.

Antimicrobianos	Distribuição dos isolados de acordo o perfil de susceptibilidade (n= 50)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
<b>Ampicilina</b>	23 (46%)	7 (14%)	20 (40%)
<b>Amoxicilina+ác. clavulânico</b>	42 (84%)	3 (6%)	5 (10%)
<b>Cefalotina</b>	30 (60%)	8 (16%)	12 (24%)
<b>Ceftiofur</b>	45 (90%)	1 (2%)	4 (8%)
<b>Cefepime</b>	48 (96%)	2 (4%)	--
<b>Gentamicina</b>	48 (96%)	--	2 (4%)
<b>Neomicina</b>	50 (100%)	--	--
<b>Estreptomicina</b>	38 (76%)	1 (2%)	11 (22%)
<b>Enrofloxacina</b>	46 (92%)	--	4 (8%)
<b>Ciprofloxacina</b>	49 (98%)	--	1 (2%)
<b>Tetraciclina</b>	20 (40%)	7 (14%)	23 (46%)
<b>Sulfazotrim</b>	46 (92%)	--	4 (8%)

**Tabela 4.** Valores de IRMA para isolados de *E. coli* multirresistentes (resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos) obtidos de mastite clínica bovina e comparação da média com a média do IRMA dos isolados sensíveis.

Isolados (n=12)	IRMA <sup>1</sup>	IRMA <sup>2</sup>
4	0,583	0,833
6	0,333	0,666
9	0,250	0,500
11	0,333	0,666
21	0,333	0,666
23	0,333	0,666
26	0,250	0,500
27	0,500	0,833
32	0,416	0,666
39	0,583	1,000
40	0,333	0,666
49	0,333	0,500
<b>Média</b>	0,382	0,667
<b>Média sensíveis</b>	0,068	0,127
<b>P<sup>3</sup></b>	<0,0001	<0,0001

<sup>1</sup>IRMA calculado considerando-se o número de antimicrobianos para o qual observou-se resistência.

<sup>2</sup>IRMA calculado considerando-se o número de classes de antimicrobianos para o qual observou-se resistência. P<sup>3</sup>: probabilidade pelo teste do qui-quadrado.



## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A classificação filogenética dos isolados de *E. coli* do presente estudo, tanto de cepas comensais quanto de cepas oriundas de casos clínicos, incluindo os estudos em subpopulações, possibilitou a observância majoritária de filo-grupos comensais, principalmente A e B1. A maior frequência de grupos comensais ocorreu independente do *status* sanitário dos animais.

Entre os isolados de mastite clínica o percentual de filo-grupos A e B1 juntos foi de 48%, entre os oriundos de fezes de bezerros, o filo-grupo B1 foi observado em 83,3% nos saudáveis e 70% nos animais com sinais clínicos de diarreia. E ainda, ambos os isolados de *E. coli* extraintestinais provenientes de surto de colisepticemia em frangos caipira, foram classificados no filo-grupo A.

Já nos estudos de subpopulações de *E. coli* em bezerros saudáveis e diarreicos, além de potros e cordeiros saudáveis, os filo-grupos comensais também foram os mais frequentes. O filo-grupo B1 foi verificado em 14 grupos clonais de bezerros saudáveis (93,3%) e em 12 de bezerros com diarreia (80%), entre os potros, os grupos filogenéticos A, B1 e C representaram 70,76% dos isolados, e entre os de cordeiros 98,5%.

Os resultados obtidos no presente estudo concordam com diversos estudos que apontam os grupos filogenéticos comensais, principalmente A e B1, como os mais comumente encontrados em animais domésticos, tanto de amostras clínicas quanto a partir de isolados comensais. (GORDON & COWLING, 2003; ESCOBAR-PARAMO et al., 2006; BALDY-CHUDZIK et al., 2008; HOUSER et al., 2008; SON et al., 2009; TENAILLON, et al., 2010; COURA et al., 2017; SOUTO et al., 2017).

Embora o filo-grupo B1 tenha sido o principal observado nas subpopulações de *E. coli* tanto de bezerros diarreicos e quanto de saudáveis, além de potros e cordeiros saudáveis, a presença de outros filo-grupos foi verificada. A maior diversidade filogenética foi observada nas subpopulações de *E. coli* isoladas de bezerros clinicamente sadios, onde verificou-se 80% de diversidade entre as amostras analisadas, seguido das subpopulações isoladas de potros (69,2%), de bezerros com diarreia (40%) e de cordeiros (15,4%), subpopulações menos variáveis. Foram em subpopulações de *E. coli* de amostras fecais que se observou a maioria dos isolados com potencial patogênico neste estudo. Subpopulações de *E. coli* de bezerros saudáveis, de bezerros diarreicos e de potros apresentaram uma frequência de 46,7%, 40% e 21,54% de isolados pertencentes ao filo-grupo E, respectivamente. O filo-grupo D teve uma

frequência de 33,3% nas subpopulações de *E. coli* de bezerros diarreicos e B2 de 20% nas subpopulações de *E. coli* de bezerros saudáveis.

Esses dados demonstram a variabilidade genética de *E. coli* no ambiente intestinal, onde isolados fenotipicamente indistinguíveis, porém com características genóticas diferentes podem coexistir, concordando com Saint-Ruf et al. (2004) de que cepas de *E. coli* isoladas de uma mesma amostra possuem clones que podem possuir características distintas. A elevada concentração bacteriana no intestino associada à plasticidade genômica de *E. coli* possibilita essa grande variabilidade (CROXEN & FINLAY, 2010).

É importante ressaltar que o emprego da metodologia de Clermont et al. (2013), torna mais completa e fidedigna a classificação filogenética de isolados de *E. coli*, uma vez que a utilização da metodologia de Clermont et al. (2000), atribui apenas a existência de quatro grupos filogenéticos, e classificações errôneas podem ocorrer.

A capacidade de *E. coli* causar doença não está diretamente ligada aos grupos filogenéticos a que pertencem (LEIMBACH et al., 2013), a classificação filogenética auxilia, principalmente, predizer se um isolado apresenta potencial patogênico ou não (CLERMONT et al., 2013). Porém, o que é importante para a ocorrência de uma enfermidade é a presença de fatores de virulência, bem como a capacidade de sobrevivência frente a determinados antimicrobianos. Essa premissa, pôde ser observada em relação aos isolados de *E. coli* extraintestinais oriundos de septicemia em frangos para consumo humano, observados nesse estudo, que apesar de pertencerem a grupos comensais (filo-grupo A), apresentaram diversos fatores de virulência importantes para a ocorrência de doença extraintestinal, como adesinas, invasinas, sistemas de aquisição de ferro e resistência no soro, bem como multirresistência aos antimicrobianos.

Fímbrias e toxinas são fatores de virulência importantes em isolados de *E. coli* principalmente intestinais. Os primeiros são necessários para adesão às células epiteliais intestinais e colonização enquanto que os demais para a secreção de fluidos no lúmen intestinal (FOSTER & SMITH, 2009; DUBREUIL et al., 2016). Sabe-se que mastites causadas por *E. coli*, são caracterizadas como ambientais, cuja contaminação da glândula mamária ocorre normalmente nas adjacências aos locais de ordenha. Apesar dos animais durante o manejo pré-ordenha estarem em contato direto com as fezes de outros animais, em nosso estudo, os isolados de *E. coli* de mastite clínica bovina não apresentaram relação com isolados clínicos intestinais, sendo negativos para esses fatores de virulência. Já os isolados de fezes de bezerros saudáveis e diarreicos, como esperado, foram positivos para fímbrias e/ou toxinas. Curiosamente, entre os isolados de bezerros saudáveis verificou-se elevada

prevalência de algumas toxinas, o que reafirma a grande troca de material genético no ambiente intestinal, porém com a ausência de fímbrias, determinando a eliminação pelas fezes (DUBREUIL et al., 2016).

Curli e celulose são outros importantes fatores para colonização de *E. coli* em diferentes sítios. São os principais componentes da matriz extracelular e tem ligação direta com a formação de biofilmes (SERRA & HENGGE, 2014). Levando em conta essa importante função na patogênese de *E. coli*, os isolados de mastite do presente estudo, apresentaram uma frequência dos genes *csgA* (curli) e *bcsA* (celulose) abaixo do esperado quando comparado com dados de outros estudos, que relatam 100% de frequência em isolados de mastite (DYER et al., 2010), porém poucos estudos relacionando esses fatores com isolados de *E. coli* de mastite bovina estão disponíveis em literatura.

Poucos isolados de mastite (10%) apresentaram capacidade de formação de biofilme *in vitro*, podendo outros fatores associados à glândula mamária estarem envolvidos na formação de biofilme *in vivo*. Os isolados de mastite formadores de biofilme além de positivos para os genes citados, expressaram curli ou curli + celulose em ensaios *in vitro*, demonstrando forte relação entre si. Em contrapartida, entre os isolados de fezes de bezerros (diarreicos e não diarreicos), a frequência de presença dos genes foi elevada assim como a expressão de curli ou curli e celulose, mostrando-se importantes para isolados de *E. coli* de fezes, uma vez que são escassos os estudos envolvendo esses fatores a partir de isolados de *E. coli* intestinais.

O uso indiscriminado de antimicrobianos está diretamente relacionado à emergência de resistência bacteriana, consistindo em um assunto preocupante quando se trata de saúde coletiva. O presente estudo apresentou dados que acompanham tendências mundiais de resistência bacteriana. A associação entre evidências do uso e a resistência aos antimicrobianos foi verificada nesse estudo. Os antimicrobianos com maiores taxas de ineficiência frente aos isolados de *E. coli* – tetraciclina, ampicilina, estreptomicina e sulfonamida – estão entre os mais utilizados na produção pecuária em diferentes países, inclusive o Brasil.

Nos estudos de subpopulações de *E. coli*, pôde-se observar variabilidade em relação ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, verificando-se isolados com perfis de resistência responsáveis por possível transferência de genes a outros isolados de uma mesma população, além de uma possível ineficiência no tratamento instituído.

## 9 CONCLUSÕES

Através da realização do presente trabalho foi possível concluir:

1. Grupos filogenéticos comensais (A e B1) são os mais frequentemente observados em isolados de *E. coli* de diferentes espécies animais, independente do seu *status* sanitário.
2. Subpopulações de *E. coli* de uma mesma amostra fecal apresentam diversidade de grupos filogenéticos, podendo coexistir populações com potencial patogênico e não patogênico em uma mesma amostra.
3. O emprego da metodologia de Clermont et al. (2013) para a caracterização de isolados de *E. coli*, possibilita uma classificação filogenética mais apurada do que a de Clermont et al. (2000), possibilitando uma análise mais detalhada dos isolados.
4. Isolados de *E. coli* de mastite bovina avaliados no presente estudo não apresentam fímbrias e toxinas relacionados a patotipos enterotoxigênicos.
5. Outros fatores, além de curli (*csgA*) e celulose (*bcsA*), relacionados à glândula mamária podem ser necessários para a formação de biofilme, uma vez que a formação de biofilme *in vitro* foi baixa.
6. Isolados de *E. coli* intestinais na espécie bovina apresentam elevada frequência e expressão de genes *csgA* e *bcsA*, porém praticamente inexistência de formação de biofilme *in vitro*, conforme metodologia empregada.
7. Coinfecção de isolados de APEC, baseado em perfis de virulência distintos, como causa de elevada mortalidade em um lote de frangos caipira para consumo humano.
8. Tetraciclina, ampicilina, estreptomicina e sulfonamida são os antimicrobianos com maiores taxas de resistência para isolados de *E. coli* independente da espécie animal, seguindo tendências mundiais.
9. Variabilidade no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos ocorre em subpopulações de *E. coli* intestinais, que pode incorrer na seleção de isolados resistentes.

## REFERÊNCIAS

- AKABAS, M. H. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 3729-3732, 2000. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/275/6/3729.long>>. Acesso em: 11 jan 2017.
- AN, H. et al. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. **Microbial Pathogenesis**, v. 28, n. 5, p. 291-300, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401099903467?via%3Dihub>>. Acesso em: 07 jan 2017.
- BALDY-CHUDZIK, K.; MACKIEWICZ, P.; STOSIK, M. Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. **Veterinary Microbiology**, v. 131, p. 173-184, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113508000953>>. Acesso em: 15 jan 2017.
- BARBIERI, N. L. et al. Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. **Plos One**, 8:e72322, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0072322>>. Acesso em: 03 jan 2017.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal>>. Acesso em: 01 fev 2017.
- BRITO, B. G. et al. Fatores de virulência presentes em amostras de *E. coli* uropatogênicas UPEC para suínos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 645-652, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010384782004000200050&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010384782004000200050&script=sci_abstract&tlng=pt)>. Acesso em: 20 dez 2016.
- CHANTZIARAS, I. et al. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 827-834, 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/69/3/827/788896/Correlation-between-veterinary-antimicrobial-use>>. Acesso em: 07 jan 2017.
- CLERMONT, O. et al. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4555-4558, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92342/>>. Acesso em: 15 dez 2016.
- CLERMONT, O. et al. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 654-662, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156713481100030X>>. Acesso em: 15 dez 2016.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, p. 58-65, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1758-2229.12019/abstract>>. Acesso em: 15 dez 2016.

COURA, F. M. et al. Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil. **Folia Microbiologica**, p. 1-6, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/sci-hub.cc/article/10.1007%2Fs12223-016-0480-9>>. Acesso em: 18 jan 2017.

CROXEN M. A.; FINLAY B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Microbiology Reviews**, v. 8, p. 20-38, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n1/full/nrmicro2265.html>>. Acesso em: 05 jan 2017.

CROXEN, M. A. et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/26/4/822.long>>. Acesso em: 07 jan 2017.

DAVIES, D. G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/280/5361/295.long>>. Acesso em: 15 dez 2016.

DAVIS, J. M. et al. Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 5301–5310, 2005. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/73/9/5301.long>>. Acesso em: 18 dez 2016.

DEAN, E. A. Comparison of receptors for 987P pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* in the small intestines of neonatal and older pig. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 4030-4035, 1990. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/58/12/4030.long>>. Acesso em: 03 jan 2017.

DHO-MOULIN M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v. 30, p. 299–316, 1999. Disponível em: <<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00902571/document>>. Acesso em: 20 nov 2016.

DOBRINDT, U. et al. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 357-371, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422105001037>>. Acesso em: 19 nov 2016.

DOGAN, B. et al. Phylogroup and *lpfA* influence epithelial invasion by mastitis associated *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 159, p. 163–170, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113512002003>>. Acesso em: 05 jan 2017.

DOUGAN, G. et al. The *Escherichia coli* gene pool. **Current Opinion in Microbiology**, England, v. 4, n. 1, p. 90-94, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527400001703>>. Acesso em: 20 dez 2016.

DUBREUIL, J. D. *Escherichia coli* STb enterotoxin. **Microbiology**, v. 143, p. 1783-1795, 1997. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00>>

221287-143-6-1783#tab2>. Acesso em: 20 dez 2016.

DUBREUIL, J. D. The whole Shebang: the gastrointestinal tract, *Escherichia coli* enterotoxins and secretion. **Current Issues in Molecular Biology**, 14:71-82, 2012. Disponível em: <<http://www.caister.com/cimb/v/v14/71.pdf>>. Acesso em: 19 jan 2017.

DUBREUIL, J. D.; ISAACSON, R. E.; SCHIFFERLI, D. M. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **EcoSal Plus**, 7(1), 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5123703/>>. Acesso em: 05 jan 2017.

DYER, J. G. et al. Curli Production and Genetic Relationships Among *Escherichia coli* from Cases of Bovine Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 193-201, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207726206>>. Acesso em: 10 jan 2017.

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. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03079450802216652>>. Acesso em: 17 nov 2016.

EDWARDS, R. A.; PUENTE, J. L. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 282-287, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X98012888>> Acesso em: 16 set 2016.

ESCOBAR-PARAMO, P. et al. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 1975-1984, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.14622920.2006.01077.x/abstract;jsessionid=34221D6696B646CD876576844DD0D488.f04t02>>. Acesso em: 15 jan 2017.

EWERS, C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis causing *Escherichia coli*: How closely related they are? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 163-176, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422107000173>>. Acesso em: 18 nov 2016.

FERREIRA, A. J. e KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. FACTA – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, SP, 2000, 197-207.

FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 25, p. 13-16, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072008000911>>. Acesso em: 21 dez 2016.

FRÖHLICHER, E. et al. Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 144, 2008. Disponível em: <<http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-8-144>>. Acesso em 05 jan 2017.

FUJII, Y. et al. Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. **FEMS Microbiology Letters**, v. 130, p. 259-265, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037810979500216R>>. Acesso em: 16 dez 2016.

GAO, Y. et al. Changes in gut microbial populations, intestinal morphology, expression of tight junction proteins, and cytokine production between two pig breeds after challenge with *Escherichia coli* K88: a comparative study. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 5614-5625, 2013. Disponível em: <<https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/articles/91/12/5614>>. Acesso em: 18 dez 2016.

GOPHNA, U. et al. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 2659-65, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98204/>>. Acesso em: 19 nov 2016.

GARCIA, T. A. et al. Cytotoxic Necrotizing Factor 1 and Hemolysin from Uropathogenic *Escherichia coli* Elicit Different Host Responses in the Murine Bladder. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 1, p. 99–109, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3536159/>>. Acesso em: 17 dez 2016.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, p. 710–713, 1991. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/254/5032/710.long>>. Acesso em: 18 dez 2016.

GOLDSTONE, R. J.; HARRIS, S.; SMITH, D. G. E. Genomic content typifying a prevalent clade of bovine mastitis associated *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, 6:30115, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep30115>>. Acesso em: 18 dez 2016.

GORDON, D. M. & COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. **Microbiology**, v. 149, p. 3575-3586, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14663089>>. Acesso em: 15 jan 2017.

GORDON, D. M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2484-2496, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/sci-hub.cc/doi/10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x/pdf>>. Acesso em: 07 jan 2017.

JAUREGUY, F. et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. **BMC Genomics**, v. 9, p. 560, 2008. Disponível em: <<http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-560>>. Acesso em 07 jan 2017.

HALL-STOODLEY, L. et al. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Microbiology Reviews**, v. 2, p. 95-108, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/sci-hub.cc/nrmicro/journal/v2/n2/full/nrmicro821.html>>. Acesso 17 nov 2016.

HENTON, M. M.; HUNTER, P. *E. coli* infections. In: COETZER, J. A. W. et al. **Infectious Diseases of Livestock**. Oxford University Press, 1994. p. 1085-1099.



HITOTSUBASHI, S. et al. Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 4468-4474, 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC258190/pdf/iai00035-0038.pdf>>. Acesso em: 03 jan 2017.

HOUSER, B. A. et al. Assessment of Phenotypic and Genotypic Diversity of *Escherichia coli* Shed by Healthy Lactating Dairy Cattle. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 5, n. 1, p. 41-51, 2008. Disponível em:<<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2007.0036>>. Acesso em: 20 jan 2017.

HUFNAGEL, D. A. The Biology of the *Escherichia coli* Extracellular Matrix. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507285/>>. Acesso em: 18 dez 2016.

HUG, M. J. et al. CFTR and bicarbonate secretion by [correction of to] epithelial cells. **News in Physiology Science**, v. 18:38-42, 2003. Disponível em: <<http://physiologyonline.physiology.org/content/18/1/38>>. Acesso em: 18 jan 2016.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção da Pecuária Municipal/IBGE – V. 43 (2015). Rio de Janeiro: IBGE, 2016.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Brasil em Síntese. 2017. Disponível em: <http://brasilemsintese.ibge.gov.br/agropecuaria.html>>. Acesso em: 05 de fev 2017.

JEFFREY, J. S. et al. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. **Avian Diseases**, v. 46, p. 48–52, 2002. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11922349>>. Acesso em: 15 nov 2016.

JOHNSON, J. R. et al. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 183, p. 78-88, 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/317656>>. Acesso em: 15 jan 2017.

JOHNSON, J. R. et al. Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 4078-4082, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2593269/>>. Acesso em: 17 dez 2016.

KAPER, J. B. et al. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 2:123-140, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n2/full/nrmicro818.html>>. Acesso em: 14 nov 2016.

KARCZMARCZYK, M. et al. Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Animals Presenting at a University Veterinary Hospital. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 20, p. 7104-7112, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3194860/#FN1>>. Acesso em: 03 jan 2017.

KENNY, B. Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p. 469-477, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422104700594>>. Acesso em: 10 out 2016.

KOLENDA, R.; BURDUKIEWICZ, M.; SCHIERACK, P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. 23, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4357325/>>. Acesso em: 06 jan 2017.

LAN, R. et al. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5080-5088, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC517479/>>. Acesso em: 13 dez 2016.

LASARO, M. A. et al. Production and release of heat-labile toxin by wild-type human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 48, p. 123-131, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2006.00134.x>>. Acesso 20 nov 2016.

LEIMBACH, A.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. *E. coli* as an All-Rounder: Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 358, p. 3-32, 2013. Disponível em: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F82\\_2012\\_303](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F82_2012_303)>. Acesso em: 02 fev 2017.

LUO, Y. et al. F4<sup>+</sup> ETEC infection and oral immunization with F4 fimbriae elicits an IL-17-dominated immune response. **Veterinary Research** (Faisalabad), v. 46, n. 121, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4618862/>>. Acesso em: 15 dez 2016.

LYNNE, A. M. et al. Characterization of a series of transconjugant mutants of an avian pathogenic *Escherichia coli* isolate for resistance to serum complement. **Avian Diseases**, v. 51, p. 771-776, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17992940>>. Acesso em: 20 out 2016.

MALIK, A. et al. Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of *eae*<sup>+</sup> *Escherichia coli* from weaned pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 82-93, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350500413X>>. Acesso em: 21 dez 2016.

MATTER, L. B. **Interação entre *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e células não fagocitárias**. Tese de Doutorado, UFRGS, 2011.

MATTER, L. B. et al. Avian Pathogenic *Escherichia coli* MT78 invades chicken fibroblasts. **Veterinary Microbiology**, v. 148, p. 51-59, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510003780>>. Acesso em: 06 fev 2017.

McLAMB, B. L. et al. Early weaning stress in pigs impairs innate mucosal immune responses to enterotoxigenic *E. coli* challenge and exacerbates intestinal injury and clinical disease. **Plos One**, 8:e59838, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3634819/>>. Acesso em: 02 fev 2017.

MEDINI, D. The microbial pan-genome. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 15, p. 589-594, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X05001759>>. Acesso em: 04 jan 2017.

MELLATA, M. Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Infections, Zoonotic Risks, and Antibiotic Resistance Trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 916-932, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3865812/>>. Acesso em: 16 nov 2016.

NAKAZATO, G. et al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479-486, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2009000700001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000700001)>. Acesso em: 10 nov 2016.

OSWALD, E. et al. Virulence factors associated with cytotoxic necrotizing factor type two in bovine diarrheic and septicemic strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2522–2527, 1991. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC270366/pdf/jcm00047-0176.pdf>>. Acesso em: 20 jan 2017.

RAFFAELLI, R. M. et al. Child care-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and hemolytic uremic syndrome. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 26, p. 951-953, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17901803>>. Acesso em: 20 jan 2017.

RIBEIRO, M. G. et al. Enfermidades por *Escherichia coli*. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e Companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016, p.243-273.

RICHARDS, V. P. et al. Genome Based Phylogeny and Comparative Genomic Analysis of Intra-Mammary Pathogenic *Escherichia coli*. **Plos One**, v. 10, n. 3, e0119799, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4373696/>>. Acesso em: 06 jan 2016.

RIPPINGER, P. et al. Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p. 281-295, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037811359400141I>>. Acesso em: 15 jan 2017.

ROMERO, D. et al. Amyloid fibres provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 2230–2234, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2836674/>>. Acesso em: 03 jan 2017.

RUSCONI, B. Whole Genome Sequencing for Genomics-Guided Investigations of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 985, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4928038/>. Acesso em: 07 dez 2016.

SAEEDI, P. et al. A review on strategies for decreasing *E. coli* O157:H7 risk in animals. **Microbial Pathogenesis**, v. 103, p. 186-195, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401016307458>>. Acesso em: 02 dez 2016.

SAINT-RUF, C.; TADDEI, F.; MATIC, I. Stress and survival of aging *Escherichia coli* rpoS colonies. **Genetics**, v. 168, n. 1, p. 541–546, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1411111/>>.

h.gov/pmc/articles/PMC1448099/>. Acesso 12 jan 2017.

SCHROEDER, G. N.; HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 134-156, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2223840/>>. Acesso em: 02 dez 2016.

SERRA, D. O.; HENGGE, R. Stress responses go three-dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 16, p. 1455-1471, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4238805/>>. Acesso em: 09 jan 2017.

SON, I.; VAN KESSEL, J. A. S.; KARNS, J. S. Genotypic Diversity of *Escherichia coli* in a Dairy Farm. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 7, p. 837-847, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19459756>>. Acesso em: 20 jan 2017.

SOUTO, M. S. M. et al. Antimicrobial susceptibility and phylotyping profile of pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates from calves and pigs in Minas Gerais, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, p. 13-23, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27709395>>. Acesso em: 31 jan 2017.

SPITZER, F. et al. A standardised challenge model with an enterotoxigenic F4<sup>+</sup> *Escherichia coli* strain in piglets assessing clinical traits and faecal shedding of fae and est-II toxin genes. **Archives of Animal Nutrition**, v. 68, p. 448-459, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313936>>. Acesso em 07 jan 2017.

TENNAILON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 207-217, 2010. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/41435720\\_The\\_Population\\_Genetics\\_of\\_Comensal](https://www.researchgate.net/publication/41435720_The_Population_Genetics_of_Comensal)>. Acesso em: 02 fev 2017.

TETTELIN, H. et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 13950-13955, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1216834/>>. Acesso em: 05 jan 2017.

TORRES, A.; PAYNE, S. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 825-833, 1997. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2958.1997.2641628.x/epdf>>. Acesso em: 05 dez 2016.

TOTH, I. et al. Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a Shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, USA, v. 69, n. 12, p. 7242-7247, dec., 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309876/>>. Acesso em: 07 dez 2016.

YURI, K. et al. Distribution of uropathogenic virulence factors among *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, p. 287-290, 1998. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/60/3/60\\_3\\_287/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/60/3/60_3_287/_pdf)>. Acesso em: 18 jan 2017.

WHIPP, S. C. et al. Comparison of enterotoxic activities of heat-stable enterotoxins from class 1 and class 2 *Escherichia coli* of swine origin. **Infection and Immunity**, v. 31, p. 245-251, 1981. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC351776/pdf/iai00165-0265.pdf>>. Acesso em: 01 fev 2017.

WILLIAMS, P. H.; GRIFFITHS, E. Bacterial transferrin receptors-structure, function and contribution to virulence. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 181, p. 301-322, 1992. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/226738170\\_Bacterial\\_transferrin\\_receptors--structure\\_function\\_and\\_contribution\\_to\\_virulence](https://www.researchgate.net/publication/226738170_Bacterial_transferrin_receptors--structure_function_and_contribution_to_virulence)>. Acesso em: 03 jan 2017.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 175-186, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n3/abs/nrmicro1614.html>>. Acesso em: 15 nov 2016.

ZHANG, W. et al. Significance of heat-stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity studies. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 3107-3114, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1479275/>>. Acesso em: 08 jan 2017.

**APÊNDICE A – RESULTADOS DA ANÁLISE DE GRUPOS FILOGENÉTICOS, CURLI E CELULOSE, FÍMBRIAS E TOXINAS E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* BEZERROS SEM DIARREIA.**

<b>Isolados</b>	<b>Grupo filogenético</b>	<b>Curli</b>	<b>Celulose</b>	<b>Expressão curli/celulose</b>	<b>Biofilme</b>	<b>Fímbrias</b>	<b>Toxinas</b>
<b>1A</b>	E	positivo	positivo	saw	Não forma	negativo	negativo
<b>1B</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Sta, LT
<b>1C</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Sta, LT
<b>1D</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb
<b>2</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb, LT
<b>3</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb, LT
<b>4</b>	B1	positivo	positivo	saw	Não forma	negativo	Stb
<b>5A</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb, LT
<b>5B</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb, LT
<b>5C</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Sta
<b>5D</b>	B1	positivo	negativo	rdar	Não forma	negativo	Stb, LT
<b>5E</b>	B1	positivo	negativo	rdar	Não forma	negativo	LT
<b>5F</b>	desconhecido	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb
<b>5G</b>	E	positivo	negativo	rdar	Não forma	negativo	Stb, Sta, LT
<b>5H</b>	B1	positivo	negativo	saw	Não forma	negativo	Sta
<b>6A</b>	E	positivo	negativo	rdar	Não forma	negativo	Sta
<b>6B</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Sta, LT
<b>6C</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb, Sta
<b>6D</b>	B1	positivo	positivo	saw	Não forma	negativo	negativo
<b>6E</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb
<b>6F</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb, LT
<b>8A</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb, LT
<b>8B</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb, Sta
<b>8C</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Formador	negativo	Sta, LT

<b>8D</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb
<b>8E</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb, LT
<b>8F</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb, LT
<b>8G</b>	B1	positivo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb, LT
<b>8H</b>	desconhecido	negativo	positivo	rdar	Não forma	negativo	Stb, LT
<b>9</b>	B1	positivo	positivo	saw	Não forma	negativo	Stb

rdar=red dry and rough (expressão curli e celulose); saw=smoothie and white (ausência de expressão de curli e celulose)

**APÊNDICE B – RESULTADOS DOS TESTES *IN VITRO* DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* DE BEZERROS SEM DIARREIA.**

<b>Isolados</b>	<b>AMP</b>	<b>AMC</b>	<b>CTF</b>	<b>COM</b>	<b>GEN</b>	<b>NEO</b>	<b>EST</b>	<b>AMI</b>	<b>ENO</b>	<b>CIP</b>	<b>NAL</b>	<b>TET</b>	<b>SUT</b>	<b>SUL</b>	<b>FLF</b>
<b>1A</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>1B</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>1C</b>	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>1D</b>	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>2</b>	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>3</b>	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>4</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5A</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S
<b>5B</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5C</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5D</b>	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5E</b>	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5F</b>	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5G</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5H</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>6A</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>6B</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>6C</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
<b>6D</b>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I
<b>6E</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>6F</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>8A</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
<b>8B</b>	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S
<b>8C</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>8D</b>	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S



<b>8E</b>	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S
<b>8F</b>	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>8G</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S
<b>8H</b>	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>9</b>	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S

AMP=ampicilina; AMC=amoxicilina+ácido clavulânico; CTF=ceftiofur; CPM=cefepime; GEN=gentamicina; NEO=neomicina; EST=estreptomicina; AMI=amicacina; ENO=enrofloxacina; CIP=ciprofloxacina; NAL=ácido nalidíxico; TET=tetraciclina; SUT=sulfazotrim; SUL=sulfonamida; FLF=florfenicol.

S=sensível; I=intermediário; R=resistente

**APÊNDICE C – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE GRUPOS FILOGENÉTICOS, CURLI E CELULOSE, FÍMBRIAS E TOXINAS E FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* DE BEZERROS COM DIARREIA.**

<b>Isolado</b>	<b>Identificação</b>	<b>Grupo filogenético</b>	<b>Curli</b>	<b>Celulose</b>	<b>Expressão curli/celulose</b>	<b>Biofilme</b>	<b>Fímbrias</b>	<b>Toxinas</b>
<b>000A</b>	<b>SB 126/15 (000)</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>1A</b>	<b>SB 126/15 (1)</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>4A</b>	<b>SB 126/15 (4)</b>	B1	negativo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>5A</b>	<b>SB 126/15 (5)</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>6A</b>	<b>SB 126/15 (6)</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>V04A</b>	<b>SB 126/15(V04)</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	F5	LT
<b>V05A</b>	<b>SB 126/15 (V05)</b>	B1	negativo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>V06A</b>	<b>SB 126/15 (V06)</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	LT
<b>V07A</b>	<b>SB 126/15 (V07)</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>722-1</b>	<b>SB 149/15 (722)</b>	D	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>733-1</b>	<b>SB 149/15 (733)</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>737-1</b>	<b>SB 149/15 (737)</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>741-1</b>	<b>SB 149/15 (741)</b>	E	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>742-1</b>	<b>SB 149/15 (742)</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>745-1</b>	<b>SB 149/15 (745)</b>	E	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>747-1</b>	<b>SB 149/15 (747)</b>	E	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	Stx
<b>144/15</b>	<b>SB 144/15</b>	C	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	LT
<b>232/96</b>	<b>SB 232/96</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	LT
<b>296/02</b>	<b>SB 296/02</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	F18	LT
<b>57/05</b>	<b>SB 57/05</b>	B1	positivo	negativo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>278/06</b>	<b>SB 278/06</b>	desconhecido	positivo	negativo	rdar	não forma	F5	Sta
<b>163/08</b>	<b>SB 163/08</b>	B1	negativo	positivo	rdar	não forma	F5	negativo
<b>33/09</b>	<b>SB 33/09</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	F18	negativo
<b>268/09</b>	<b>SB 268/09</b>	B2	positivo	positivo	rdar	não forma	F5	negativo

<b>35/12</b>	<b>SB 35/12</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	F5	negativo
<b>124/12</b>	<b>SB 124/12</b>	desconhecido	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo
<b>156/15</b>	<b>SB 156/15</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	F18	Stb, LT
<b>162/12</b>	<b>SB 162/12</b>	B1	positivo	negativo	rdar	não forma	negativo	LT
<b>168/12</b>	<b>SB 168/12</b>	E	positivo	positivo	rdar	não forma	F18	negativo
<b>108/15</b>	<b>SB 108/15</b>	B1	positivo	positivo	rdar	não forma	negativo	negativo

rdar=red, dry and rough (expressão de curli e celulose).

**APÊNDICE D – RESULTADOS DOS TESTES *IN VITRO* DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* DE BEZERROS COM DIARREIA.**

<b>Isolados</b>	<b>Identificação</b>	<b>AMP</b>	<b>AMC</b>	<b>CTF</b>	<b>CPM</b>	<b>GEN</b>	<b>NEO</b>	<b>EST</b>	<b>AMI</b>	<b>ENO</b>	<b>CIP</b>	<b>NAL</b>	<b>TET</b>	<b>SUT</b>	<b>SUL</b>	<b>FLF</b>
<b>000A</b>	SB 126/15 (000)	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S	S
<b>1A</b>	SB 126/15 (1)	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S
<b>4A</b>	SB 126/15 (4)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S
<b>5A</b>	SB 126/15 (5)	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S
<b>6A</b>	SB 126/15 (6)	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>V04A</b>	SB 126/15(V04)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>V05A</b>	SB 126/15 (V05)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
<b>V06A</b>	SB 126/15 (V06)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S
<b>V07A</b>	SB 126/15 (V07)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>722-1</b>	SB 149/15 (722)	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	R	S	S	S
<b>737-1</b>	SB 149/15 (733)	R	S	S	S	S	S	R	S	I	S	I	R	I	R	S
<b>742-1</b>	SB 149/15 (737)	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	I	S
<b>741-1</b>	SB 149/15 (741)	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S
<b>745-1</b>	SB 149/15 (742)	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S
<b>33/09</b>	SB 149/15 (745)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>163/08</b>	SB 149/15 (747)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S
<b>278/06</b>	SB 144/15	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	R	R	S
<b>232/96</b>	SB 232/96	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S
<b>168/12</b>	SB 296/02	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>108/15</b>	SB 57/05	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S
<b>124/12</b>	SB 278/06	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>35/12</b>	SB 163/08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>268/09</b>	SB 33/09	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S
<b>296/02</b>	SB 268/09	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S
<b>733-1</b>	SB 35/12	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	I	R	S	R	S

<b>747-1</b>	SB 124/12	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	I	R	S	R	S
<b>57/05</b>	SB 156/15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>162/12</b>	SB 162/12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>156/15</b>	SB 168/12	R	I	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S
<b>144/15</b>	SB 108/15	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S

AMP=ampicilina; AMC=amoxicilina+ácido clavulânico; CTF=ceftiofur; CPM=cefepime; GEN=gentamicina; NEO=neomicina; EST=estreptomicina; AMI=amicacina; ENO=enrofloxacina; CIP=ciprofloxacina; NAL=ácido nalidíxico; TET=tetraciclina; SUT=sulfazotrim; SUL=sulfonamida; FLF=florfenicol.

S=sensível; I=intermediário; R=resistente

**APÊNDICE E – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE GRUPOS FILOGENÉTICOS, CURLI E CELULOSE, FÍMBRIAS E TOXINAS E FORMAÇÃO DE BIOFIME DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* ORIUNDOS DE MASTITE BOVINA.**

<b>Isolados</b>	<b>Identificação</b>	<b>Grupo filogenético</b>	<b>Curli</b>	<b>Celulose</b>	<b>Fenótipo curli/celulose</b>	<b>Biofilme</b>	<b>Fímbrias</b>	<b>Toxinas</b>
<b>1</b>	02/15 (4) - Unesp	B1	positivo	positivo	bdar	positivo	negativo	negativo
<b>2</b>	02/15 (13) - Unesp	A	positivo	positivo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>3</b>	02/15 (19) - Unesp	A	negativo	positivo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>4</b>	02/15 (34) - Unesp	desconhecido	negativo	positivo	rdar	negativo	negativo	negativo
<b>5</b>	08/15 (23) - Unesp	A	negativo	positivo	rdar	negativo	negativo	negativo
<b>6</b>	08/15 (56) - Unesp	B1	negativo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>7</b>	08/15 (116) - Unesp	D	positivo	positivo	rdar	negativo	negativo	negativo
<b>8</b>	08/15 (122) - Unesp	A	positivo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>9</b>	08/15 (48) - Unesp	desconhecido	positivo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>10</b>	08/15 (17) - Unesp	B1	negativo	negativo	saw	negativo	negativo	negativo
<b>11</b>	10/15 (58) - Unesp	desconhecido	positivo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>12</b>	10/15 (73) - Unesp	A	negativo	positivo	rdar	negativo	negativo	negativo
<b>13</b>	10/15 (76) - Unesp	A	negativo	negativo	bdar	positivo	negativo	negativo
<b>14</b>	10/15 (1) - Unesp	A	negativo	positivo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>15</b>	15/15 (11) - Unesp	A	positivo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>16</b>	15/15 (44) - Unesp	B1	positivo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>17</b>	15/15 (5) - Unesp	B1	negativo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>18</b>	63/14 (31) - Unesp	C	positivo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>19</b>	63/14 (32) - Unesp	C	positivo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>20</b>	63/14 (41) - Unesp	desconhecido	positivo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>21</b>	63/14 (60) - Unesp	desconhecido	positivo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
<b>22</b>	63/14 (77) - Unesp	A	positivo	negativo	rdar	negativo	negativo	negativo
<b>23</b>	63/14 (87) - Unesp	F	positivo	positivo	rdar	positivo	negativo	negativo
<b>24</b>	63/14 (93) - Unesp	B1	positivo	positivo	rdar	negativo	negativo	negativo
<b>25</b>	63/14 (75) - Unesp	desconhecido	positivo	negativo	rdar	negativo	negativo	negativo

26	63/14 (82) - Unesp	A	positivo	negativo	bdar	positivo	negativo	negativo
27	64/14 (16) - Unesp	A	positivo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
28	64/14 (38) - Unesp	A	positivo	positivo	bdar	negativo	negativo	negativo
29	64/14 (57) - Unesp	B2	positivo	positivo	bdar	negativo	negativo	negativo
30	64/14 (75) - Unesp	B1	positivo	positivo	rdar	negativo	negativo	negativo
31	64/14 (82) - Unesp	A	negativo	negativo	rdar	negativo	negativo	negativo
32	01/08/15 (89) - Unesp	F	negativo	positivo	rdar	negativo	negativo	negativo
33	-- Unesp	B1	negativo	negativo	rdar	negativo	negativo	negativo
34	-- Unesp	desconhecido	negativo	negativo	pdar	negativo	negativo	negativo
35	-- Unesp	desconhecido	negativo	negativo	pdar	negativo	negativo	negativo
36	-- Unesp	desconhecido	negativo	negativo	saw	negativo	negativo	negativo
37	-- Unesp	desconhecido	negativo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
38	-- Unesp	B1	positivo	positivo	rdar	negativo	negativo	negativo
39	156.2 - 2015 Unesp	desconhecido	negativo	positivo	bdar	negativo	negativo	negativo
40	156.10 - 2015 Unesp	desconhecido	positivo	negativo	rdar	negativo	negativo	negativo
41	156.6.1 - 2015 Unesp	desconhecido	negativo	positivo	rdar	positivo	negativo	negativo
42	SB 64/10 (2137)	desconhecido	negativo	negativo	rdar	negativo	negativo	negativo
43	SB 33/09 (2)	desconhecido	negativo	negativo	rdar	negativo	negativo	negativo
44	SB 163/08 (399 PE)	desconhecido	negativo	negativo	saw	negativo	negativo	negativo
45	SB 33/09 (1)	desconhecido	negativo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo
46	SB 64/10 (1780)	A	positivo	negativo	rdar	negativo	negativo	negativo
47	SB 64/10 (1509)	desconhecido	negativo	negativo	saw	negativo	negativo	negativo
48	SB 64/10 (2240)	desconhecido	negativo	negativo	rdar	negativo	negativo	negativo
49	SB 64/10 (1742)	Clado I ou II	negativo	negativo	saw	negativo	negativo	negativo
50	SB 64/10 (2208)	A	negativo	negativo	bdar	negativo	negativo	negativo

rdar=red, dry and rough (expressão de curli e celulose); bdar= brown, dry and rough (expressão de curli); pdar= pink, dry and rough (expressão de celulose); saw= smoothie and white (ausência de expressão de curli e celulose).





26	63/14 (82) - Unesp	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
27	64/14 (16) - Unesp	R	S	R	R	I	S	S	R	R	S	R	S
28	64/14 (38) - Unesp	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
29	64/14 (57) - Unesp	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
30	64/14 (75) - Unesp	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
31	64/14 (82) - Unesp	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
32	01/08/2015 (89) - Unesp	R	I	R	R	I	S	S	R	S	S	R	S
33	-- Unesp	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
34	-- Unesp	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
35	-- Unesp	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
36	-- Unesp	R	R	R	I	S	S	S	I	S	S	S	S
37	-- Unesp	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
38	-- Unesp	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
39	156.2 - 2015 Unesp	R	I	R	S	S	R	S	R	R	S	R	R
40	156.10 - 2015 Unesp	I	S	I	S	S	S	S	R	R	S	R	R
41	156.6.1 - 2015 Unesp	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S
42	SB 64/10 (2137)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
43	SB 33/09 (2)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
44	SB 163/08 (399 PE)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
45	SB 33/09 (1)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
46	SB 64/10 (1780)	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S
47	SB 64/10 (1509)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
48	SB 64/10 (2240)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
49	SB 64/10 (1742)	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
50	SB 64/10 (2208)	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S

AMP=ampicilina; AMC=amoxicilina+ác. clavulânico; CFL=cefalotina; CTF=ceftiofur; CPM=cefepime; GEN=gentamicina; NEO=neomicina; EST=estreptomicina; ENO=enrofloxacina; CIP=ciprofloxacina; TET=tetraciclina; SUT=sulfazotrim.

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

**APENDICE G – RESULTADOS DOS TESTES *IN VITRO* DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DOS 5 GRUPOS CLONAIIS DE *Escherichia coli* ORIUNDOS DE BEZERROS SEM DIARREIA.**

<b>Amostra</b>	<b>AMP</b>	<b>AMC</b>	<b>CTF</b>	<b>COM</b>	<b>GEN</b>	<b>NEO</b>	<b>EST</b>	<b>AMI</b>	<b>ENO</b>	<b>CIP</b>	<b>NAL</b>	<b>TET</b>	<b>SUT</b>	<b>SUL</b>	<b>FLF</b>
<b>1B1</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>1B2</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>1B3</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>1B4</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>1B5</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
<b>5A1</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S
<b>5A2</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S
<b>5A3</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	I
<b>5A4</b>	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S	R	S
<b>5A5</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S
<b>5C1</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5C2</b>	I	I	S	S	S	S	I	S	S	S	I	R	S	S	I
<b>5C3</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5C4</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
<b>5C5</b>	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	R	S	R	I
<b>5D1</b>	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5D2</b>	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S	I	S
<b>5D3</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5D4</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5D5</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5H1</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S

<b>5H2</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
<b>5H3</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>5H4</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
<b>5H5</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S

AMP=ampicilina; AMC=amoxicilina+ácido clavulânico; CTF=ceftiofur; CPM=cefepime; GEN=gentamicina; NEO=neomicina; EST=estreptomicina; AMI=amicacina; ENO=enrofloxacina; CIP=ciprofloxacina; NAL=ácido nalidíxico; TET=tetraciclina; SUT=sulfazotrim; SUL=sulfonamida; FLF=florfenicol.

S=sensível; I=intermediário; R=resistente

**APÊNDICE H – RESULTADOS DOS TESTES *IN VITRO* DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DOS 5 GRUPOS CLONAIIS DE *Escherichia coli* ORIUNDOS DE BEZERROS DIARREICOS.**

<b>Issolados</b>	<b>AMP</b>	<b>AMC</b>	<b>CTF</b>	<b>COM</b>	<b>GEN</b>	<b>NEO</b>	<b>EST</b>	<b>AMI</b>	<b>ENO</b>	<b>CIP</b>	<b>NAL</b>	<b>TET</b>	<b>SUT</b>	<b>SUL</b>	<b>FLF</b>
<b>5A</b>	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S
<b>5B</b>	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S
<b>5C</b>	R	S	S	S	S	S	R	S	I	S	R	R	R	R	I
<b>5D</b>	R	I	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S
<b>5E</b>	R	S	S	S	S	S	R	S	I	S	R	R	R	R	S
<b>000A</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S	S
<b>000B</b>	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S	R	R	S	S	I
<b>000C</b>	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S
<b>000D</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S
<b>000E</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	I
<b>V07A</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>V07B</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
<b>V07C</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	R	S
<b>V07D</b>	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	R	S	R	S
<b>V07E</b>	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S
<b>733-1</b>	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	I	R	S	R	S
<b>733-2</b>	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	R	R	R	S
<b>733-3</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>733-4</b>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S
<b>733-5</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	R	S
<b>742-1</b>	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	I	S

<b>742-2</b>	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	R	S	R	S
<b>742-3</b>	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	R	S
<b>742-4</b>	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	R	S	R	S
<b>742-5</b>	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S

AMP=ampicilina; AMC=amoxicilina+ácido clavulânico; CTF=ceftiofur; CPM=cefepime; GEN=gentamicina; NEO=neomicina; EST=estreptomicina; AMI=amicacina; ENO=enrofloxacina; CIP=ciprofloxacina; NAL=ácido nalidíxico; TET=tetraciclina; SUT=sulfazotrim; SUL=sulfonamida; FLF=florfenicol.

S=sensível; I=intermediário; R=resistente