

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PATRÍCIA GIOVANA HOEPERS**

**CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE PERUS**

**UBERLÂNDIA**

**2016**

**PATRÍCIA GIOVANA HOEPERS**

**CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE PERUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva.

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca.

**Uberlândia**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

H694c      Hoepers, Patrícia Giovana, 1985  
2016      Caracterização de *Escherichia coli* isoladas de perus / Patrícia  
Giovana Hoepers. - 2016.  
87 f. : il.

Orientador: Paulo Lourenço da Silva.  
Coorientadora: Belchiolina Beatriz Fonseca.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. *Escherichia coli* - Teses. 3. Peru (Ave) -  
Doenças - Teses. I. Silva, Paulo Lourenço da, 1956-. II. Fonseca,  
Belchiolina Beatriz, 1978-. III. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

---

CDU: 619

## **CARACTERIZAÇÃO DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE PERUS**

Dissertação aprovada para obtenção do título de Mestre no programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia (MG) pela banca formada por:

Uberlândia, 29 de Março de 2016

---

Prof. Dr. Paulo Lourenço Silva, UFU/MG

---

Professora Dr<sup>a</sup>. Daise Aparecida Rossi, UFU/MG

---

Dr. Ivomar Oldoni, BRF



## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**PATRÍCIA GIOVANA HOEPERS** - Nascida em Joinville, Estado de Santa Catarina, em 12 de outubro de 1985, filha de Luiz Gonzaga Hoepers e Wally Gertrudes Hoepers. Médica Veterinária, graduada em 10 de dezembro de 2009 pela Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias. Durante a graduação foi bolsista de extensão e pesquisa da CAPES no laboratório de patologia animal. Em abril de 2010 iniciou sua carreira nos Laboratórios de Saúde Animal da BRF na unidade de Videira-SC, em seguida em Rio Verde-GO até sua transferência para Uberlândia-MG em abril de 2011. Em março de 2015 assumiu o cargo de supervisora do Laboratório de Saúde Animal de Uberlândia. Em 2014 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Saúde Animal, com a orientação do Prof. Dr. Paulo Lourenço da Silva e co-orientação da Prof<sup>a</sup> Belchiolina Beatriz Fonseca. Tem experiência nas seguintes áreas: microbiologia de patógenos de aves e suínos, doenças de aves e suínos, biologia molecular, *Salmonella* spp., gestão de pessoas.

*Dedico aos meus pais Luiz e Wally pelo  
amor, apoio e exemplo de luta e superação.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço àquele que chamam Deus, mas que eu, na minha eterna ignorância, prefiro chamar de essência ou energia fundamental. Aos meus pais Luiz e Wally Hoepers que, mesmo sem cursar o ensino médio, sempre valorizaram a cultura e a educação, foram exemplos e me incentivaram a acreditar em meu potencial e me reinventar sempre que fosse necessário. “Seja como a Fênix filha, renasça das cinzas” certa vez disse meu pai, frase que sempre recordo nos momentos difíceis. Ao meu namorado Flávio Lúcio Guimarães um verdadeiro parceiro de todas as horas e grande incentivador. Aos meus sogros Leninha e Aires pelo carinho e cuidado. Aos meus irmãos Djin, Luciane, Joziane, Luiz e Jaqueline pelo carinho.

Agradeço à BRF representada nas figuras da Priscilla Koerich, Ivomar Oldoni e João Zuffo pelo incentivo e liberação para cursar o mestrado, pessoas que acreditaram no meu potencial e são modelos de profissionais para mim. Um agradecimento especial para a Priscilla por acreditar no meu sonho, pelo auxílio no crescimento profissional e por ser um exemplo de dedicação e competência. Ao João por ser um líder excepcional e sempre me instigar a buscar a superação. Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Lourenço pela confiança, parceria e exemplo de profissional da avicultura. Ao colega Marcelo Resende, que me auxiliou na busca do mestrado e me indicou ao professor Paulo Lourenço, obrigada pelo voto de confiança!

À minha co-orientadora Belchiolina ou Bia, por ser uma professora e pesquisadora incansável que além de me ensinar ciência deu lições de determinação e se tornou uma grande amiga. Bia você é referência de profissional e pessoa para mim, minha mais profunda gratidão! Aos seus filhos João Lucas e Pedro, parceirinhos dessa jornada, garantiram alegria e emoção. Fiquei apaixonada por eles! Agradeço a “tia Nete” e a família da Bia que cuidou dos meninos quando foi preciso roubar a mãe deles.

Agradeço imensamente à professora Daise pelos conselhos, auxílio nos testes e a liberação da estrutura do seu laboratório. Ao Edson por sua competência e auxílio valioso nas análises. Não poderia deixar de registrar minha admiração e gratidão aos demais colegas do Labio: Guilherme, Eliane, Roberta, Luiza, Ricardo e Felipe. Um agradecimento especial às minhas colegas de mestrado Jocasta e Marcela.

Aos colegas dos Laboratórios de Saúde Animal da BRF pelo auxílio com as análises e apoio em todas as horas, especialmente: Tiago, Cidiane, Éder, Pricila, Roberta, Marcela,

Caroline, Débora, Gutemberg, Gabriel, Camilla, Gleik, Adair, Delcides, Mirtes, Cida, Madalena, Camilla Plieski, Vinícius, Raquel e Poliana. Tenho orgulho de ser parte dessa equipe!

À FAPEMIG, pelo financiamento parcial do projeto.

## RESUMO

*Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) pertencem à classe das ExPEC (*Extra intestinal Escherichia coli*). As APEC são responsáveis por doenças localizadas ou sistêmicas nas aves de produção denominadas colibacilose aviária. Perus, ao contrário de frangos de corte têm uma vida longa e por isso são mais susceptíveis ao aparecimento de doenças, a colibacilose respiratória e septicêmica é uma delas. Os avanços em genotipificação e sequenciamento têm demonstrado semelhanças de isolados APEC com ExPEC humanas, trazendo à tona a possibilidade desses isolados terem impacto na saúde pública como patógenos ou como reservatórios de genes de virulência. A mesma preocupação ocorre com a resistência a antimicrobianos nas comunidades humanas. A caracterização de isolados de *E. coli* de aves já foi feita por diversos autores em todo o mundo. No Brasil, publicações recentes caracterizaram quanto à virulência e resistência a antimicrobianos isolados de *E. coli* de lesões de celulite em frangos de corte e sacos aéreos acometidos por aerossaculite em perus. No entanto, nenhum trabalho foi realizado contemplando amostras dos principais estados produtores e a produção de beta-lactamases, ESBL (beta-lactamases de espectro estendido) e pAmpC (cefalosporinases localizadas em plasmídeos). O objetivo dessa dissertação foi caracterizar isolados de *E. coli* em órgãos de perus com suspeita de colibacilose quanto à presença de cinco genes associados ao plasmídeo CoIV, acessar a resistência a importantes antimicrobianos na avicultura e na saúde humana e verificar a presença de genes responsáveis por beta-lactamases, ESBL, pAmpC e classificação filogenética em isolados com fenótipo de resistência a amoxicilina e ceftiofur. Os resultados mostraram 84,3% dos isolados com quatro e cinco genes sendo classificados como APEC, os isolados selecionados para classificação filogenética pertencem principalmente aos grupos B1 e D. Dos isolados analisados 82,14% foram considerados MDR (multirresistentes a antimicrobianos), os maiores índices de resistência foram para eritromicina (99%) e amoxicilina (76,1%). Os 43 isolados que foram resistentes ou intermediários para ceftiofur no antibiograma foram positivos para ESBL ou pAmpC. Dos genes associados a ESBL 79,4% foram positivos para blaCTX-M-2 e 20,59% para blaCTX-M-8/25. Os nove isolados pAmpC foram positivos para blaCMY-II. O estado de Goiás foi responsável pela maioria dos isolados resistentes para ceftiofur (72,22%) e foi o único estado onde genes blaCMY-II foram identificados. Esse estudo demonstra a alta prevalência de APEC em isolados de casos suspeitos de colibacilose em perus, alto índice de resistência a antimicrobianos e alerta para a resistência a ceftiofur e a presença de *E. coli* ESBL e pAmpC na cadeia produtiva de perus.

Palavras-chave: APEC, ESBL, pAmpC, perus

## ABSTRACT

Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) are part of the class of ExPEC (Extra intestinal *Escherichia coli*). APEC cause localized or systemic disease in poultry production termed avian colibacillosis. Turkeys, unlike broilers have a long life and are therefore more susceptible to onset of diseases, respiratory and septicemic disease caused by *E. coli*. Advances in genotyping and sequencing have shown similarities of APEC isolates with human ExPEC, bringing up the possibility of these isolates play a role on public health as pathogens or as virulence genes reservoirs. Antimicrobial resistance in human communities caused by multidrug resistant *E.coli* is also a huge concern. Many authors have done the characterization of *E. coli* isolated from poultry. In Brazil, recent publications characterized the virulence and antimicrobial resistance of *E. coli* isolated from cellulitis lesions in broilers and air sacs affected by aerosacculitis in turkeys. However, no study was carried out considering samples of the main producing States and the production of beta-lactamases, ESBL (extended spectrum beta-lactamase) and pAmpC (plasmid-mediated cephalosporinases) in the isolates. The aim of this study was to characterize isolates of *E. coli* in turkeys organs suspected of colibacillosis for five genes associated with plasmid CoIV, access the antimicrobial resistance in important antimicrobials for poultry and human health and check the presence of genes for beta-lactamase, ESBL, pAmpC and phylogenetic classification *E. coli* with the resistance phenotype for ceftiofur and amoxicillin. The results showed that 84.3% of the isolates harbored four or five genes being characterized as APEC, the selected isolates for phylogenetic classification belong mainly to groups B1 and D. In total, 82.14% of isolates were considered MDR (multidrug resistant to antimicrobials); higher resistance indices were to erythromycin (99%) and amoxicillin (76.1%). The 43 isolates resistant or intermediate to ceftiofur on antibiogram were positive for ESBL or pAmpC. ESBL genes associated were 79.4% *bla*CTX-M-2 and 20.59% *bla*CTX-M-8 /25. Nine isolates that were positive for pAmpC were *bla*CMY II. The state of Goiás was responsible for most of the isolates resistant to ceftiofur and was the only where *bla*CMY-II genes have been identified. This study demonstrates the high prevalence of APEC in suspected cases of colibacillosis in turkeys, high antimicrobial resistance index and alert for resistance to ceftiofur and the presence of *E. coli* ESBL and pAmpC in the production chain of turkeys.

Keywords: APEC, ESBL, pAmpC, turkeys

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Características da avicultura Brasileira.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Espécie <i>Meleagris gallopavo</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Colibacilose aviária.....</b>	<b>17</b>
3.3.1 Apresentação localizada de colibacilose.....	18
3.3.2 Colisepticemia: Colibacilose Aviária Generalizada.....	20
<b>3.4 <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>Fatores de Virulência <i>Escherichia coli</i> patogênicas para aves</b>	
<b>3.5 (APEC).....</b>	<b>24</b>
3.5.1 Capacidade de aderência no trato respiratório e colonização de órgãos internos.....	25
3.5.2 Resistência ao sistema imune.....	27
3.5.3 Obtenção de ferro.....	28
3.5.4 Produção de Toxinas.....	29
<b>3.6 Resistência a antimicrobianos.....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>



<b>CAPÍTULO 2 CARACTERIZAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> ISOLADAS DE PERUS NO BRASIL.....</b>	<b>51</b>
<b>APÊNDICE A - INSTRUÇÕES AOS AUTORES- Brazilian Journal of Microbiology</b>	<b>77</b>

## **CAPÍTULO 1**

### **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## 1 INTRODUÇÃO

Os isolados de *Escherichia coli* implicadas em doenças nas aves são conhecidas como *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC). As APEC se encontram na classe da ExPEC (*Extra intestinal Escherichia coli*). De maneira geral, infecções extras intestinais causadas pelo agente em aves são denominadas de colibacilose aviária. Entre as doenças causadas pelas APEC as mais importantes são: colibacilose respiratória, septicemia aguda, salpingite, infecções do saco da gema e a síndrome da cabeça inchada (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

A colibacilose aviária está relacionada a vultosas perdas na cadeia produtiva de aves. Estima-se que pelo menos 30% dos rebanhos de aves nos Estados Unidos é afetado pela doença em algum ponto da cadeia produtiva (EWERS et al., 2007). No Brasil a produção de aves é muito competitiva, em 2014 alcançou 2,7 milhões de toneladas produzidas, o sucesso do país no setor se dá sobretudo por sua alta capacidade de produção de grãos e baixo custo da mão-de-obra. Por outro lado, doenças bacterianas foram apontadas como importante causador de prejuízos econômicos por queda de produtividade e condenações no abatedouro (FALLAVENA et al., 2000). Segundo registros oficiais, 4% das aves abatidas no Brasil são condenadas por aerossaculite e 1,3% por lesões causadas por colibacilose (BRASIL, 2013).

Por muito tempo *E. coli* foi considerada somente como um agente oportunista na colibacilose aviária, condições de ambiência precárias e baixa imunidade eram considerados fatores essenciais para o aparecimento da doença. Com o avanço das pesquisas em biologia molecular e trabalhos com inoculação experimental foi possível verificar a existências de isolados altamente virulentos que são capazes de causar doença mesmo em condições ideais de manejo e imunidade. (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003). Por outro lado, os fatores predisponentes não devem ser ignorados e, em muitos casos, desempenham papel essencial no aparecimento da doença (COLLINGWOOD et al., 2014).

A sobrevivência, multiplicação e colonização de órgãos do hospedeiro fora do ambiente intestinal é uma tarefa difícil para a *E. coli* e demandam habilidades especiais como a capacidade de adesão, sobrevivência aos fatores do sistema imune e obtenção de ferro, elemento essencial para o seu metabolismo. A pesquisa de genes que codificam fatores ligados ao estilo de vida extra intestinal da *E. coli* é bastante ampla e permitiu a identificação de

diversos genes associados a isolados reconhecidos como APEC (JOHNSON et al., 2006; LI; EWERS; WIELER, 2005; STORDEUR et al., 2002).

Apesar de grandes variações nos genes identificados nas APEC, algumas pesquisas têm demonstrado a possibilidade de conjunto de genes serem utilizados como preditivos para a detecção e caracterização de APEC (EWERS et al., 2005; JOHNSON et al., 2008a; PASS; ODEDRA; BATT, 2000; SCHOULER et al., 2012). Essas pesquisas levam em consideração as habilidades para sobrevivência no ambiente extra intestinal do hospedeiro. Johnson e colaboradores (2008a) identificaram cinco genes considerados como mínimos para a identificação de isolados como APEC. Após testar os genes *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT* em 994 isolados de *E. coli* o pentaplex foi capaz de discriminar corretamente 85,4% das APEC e 79% das AFEC (*Avian Fecal Escherichia coli*).

Estudos recentes apontaram a semelhança de isolados de APEC com outros patótipos extra intestinais relacionados com doenças em humanos como UPEC (*Uropathogenic Escherichia coli*) e NMEC (*Neonatal meningitis-causing Escherichia coli*). A Inoculação experimental de alguns desses isolados de APEC em mamíferos usados como modelo humano resultaram em doença, fato que levanta a possibilidade das aves atuarem como reservatório de ExPEC humanas (EWERS et al., 2007; JAKOBSEN et al., 2012; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b; VICENT et al., 2010).

A questão de saúde pública é levantada também quando se fala sobre resistência a antimicrobianos. Há evidências demonstrando que tanto isolados de APEC como isolados AFEC estão cada vez mais resistentes aos agentes antimicrobianos (CUNHA et al., 2014; JOHNSON et al., 2004; SÒLÁ-GINÉS et al., 2015). Esse fato, além de tornar o controle da colibacilose aviária cada vez mais difícil, pode implicar na disseminação de genes de resistência e acarretar em bactérias que afetam humanos carregando esses genes. Relatos de *E. coli* MDR (*multidrug resistant*) isoladas de carcaças de frango tornaram esse assunto uma preocupação crescente de produtores e consumidores (MANGES; JOHNSON, 2012; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O estudo teve como objetivo geral caracterizar isolados de *E. coli* de órgãos de perus com suspeita de colibacilose, verificar a resistência a antimicrobianos e acessar a presença de genes responsáveis por produção de beta-lactamases.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a presença dos genes *intA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT* associados principalmente ao plasmídeo CoIV e caracterização como APEC ou comensais;
- Determinar a resistência aos antimicrobianos norfloxacin, enrofloxacin, amoxicilina, ceftiofur, oxitetraciclina, tetraciclina, colistina, eritromicina, sulfametoxazol associado a trimetoprim, lincomicina e espectinomicina, fosfomicina, apramicina, estreptomicina, neomicina, gentamicina;
- Verificar a presença de genes codificadores de enzimas beta-lactamases *bla*TEM e *bla*SHV *wild type* (WT), *bla*CTX-M-1, 2, 8/25 e 9 e *bla*SHV e *bla*TEM com alterações genéticas responsáveis por acarretar em perfil de ESBL, pAmpC *bla*CMY II, *bla*DHA, *bla*FOX, *bla*ACC, *bla*ACT/MIR, *bla*CMY/MOX, em isolados com fenótipo de resistência a amoxicilina e ceftiofur;
- Classificar isolados selecionados por resistência a beta-lactâmicos nos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Características da avicultura Brasileira**

Nas últimas décadas a indústria avícola deixou de ser caracterizada por pequenas propriedades para torna-se um exemplo de economia em escala, necessitando de alta eficiência operacional já que precisa responder ao aumento crescente por demanda de proteína animal e aos desafios sanitários (BACK, 2007). Hoje é um importante segmento da economia brasileira correspondendo com 1,5% do PIB e empregando 3,6 milhões de pessoas (UBABEF, 2015).

As exportações brasileiras aumentaram nos anos 1970 crescendo também o investimento em tecnologia de abate e processamento e em meados de 1990 o Brasil se consolidou como um dos principais produtores de carnes de aves no mundo. As exportações aumentaram significativamente em 2005, com 2,846 milhões de toneladas, devido à gripe aviária que retirou a Tailândia do posto de maior exportadora de carne de frango (SAVAGLIA, 2009). Em 2014 o Brasil foi o terceiro em produção de carne de frango com 12,69 milhões de toneladas e o principal exportador mundial com 4,09 milhões de toneladas. Em comparação com 2013 houve um acréscimo de 3,11%, ano que foram produzidos 12,308 milhões de toneladas (UBABEF, 2015).

A produção brasileira de perus em 2014 foi de 326.627 toneladas ficando atrás somente dos Estados Unidos e União Europeia. Ocupa a mesma posição em exportação, com 125.000 toneladas exportadas em 2014, sendo os principais estados exportadores em ordem decrescente são o Paraná (29,31%), Santa Catarina (24,75%), Goiás (19,14%), Rio Grande do Sul (17,56%) e Minas Gerais (9,24%). As exportações brasileiras são bastante diversificadas, no período que vai de 2009 ao primeiro semestre de 2014 foram realizadas transações com 104 diferentes países com destaque para os países baixos (UBABEF, 2015).

### 3.2 Espécie *Meleagris gallopavo*

Perus pertencem ao gênero *Meleagris* com variantes selvagens e domésticas, originárias das Américas, essa espécie pertence ao filo Chordata, na classe aves, ordem Galliformes, família Meleagrididae, gênero *Meleagris* e espécies *Meleagris gallopavo* e *Melleagris ocellata* (COSTA, 2006).

No Brasil há a predominância das raças “Mamonth Bronze Broad – Breasted”, “Mamouth White Broad – Breasted”, “White Holland” de tamanho médio e “Beltville Small White” de tamanho menor. As grandes indústrias produtoras de alimentos vêm cruzando, para obter animais para o abate peruas “Mamouth” com Bronze ou “Bourbon Red” ou “White Holland” e também animais fornecidos pela *British United Turkeys of America* (BUTA). O grupo Aviagen fornecedor da linhagem Nicholas adquiriu a BUTA, tornando-se o principal fornecedor de ovos incubados para a produção de perus (COSTA, 2006).

### 3.3 Colibacilose aviária

O termo colibacilose é utilizado para qualquer infecção, sistêmica ou localizada causada inteiramente ou parcialmente por *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC). Entre as infecções causadas pelo agente estão septicemia, coligranulomas, doença respiratória crônica ou doença dos sacos aéreos, celulite, síndrome da cabeça inchada, peritonite, salpingite, complexo da osteomielite dos perus, inflamação do pannus, onfalite e infecção do saco da gema (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

APEC pode atuar como agente primário ou secundário na colibacilose (ANTAO et al., 2008). *E. coli* está presente no trato intestinal da maioria dos animais e é eliminada nas fezes em grande quantidade. O contato direto e indireto com outros animais ou fezes pode introduzir novas linhagens em uma população de aves. Pássaros de vida livre são de grande importância epidemiológica quando são colonizados por bactérias já adaptadas às espécies domésticas. A maioria, se não todas as espécies de aves, são susceptíveis à colibacilose. No entanto, a

observação clínica da doença é mais frequente em galinhas, perus e patos (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

### 3.3.1 Apresentação localizada de colibacilose

A onfalite que é a inflamação do umbigo, no caso das aves normalmente envolve o acometimento do saco da gema. Olsen e colaboradores (2012) demonstraram que *E. coli* é responsável por boa parte de infecções bacterianas que causam mortalidade na primeira semana de pintinhos, causando onfalite e infecção do saco da gema com e sem septicemia. Infecções como essa podem originar de reprodutoras com salpingite em que o saco da gema se torna infectado no ovo ou então no ambiente do incubatório (MOKADY et al., 2005; VANDEKERCHOVE et al., 2004).

Após a contaminação do saco da gema alguns embriões podem morrer antes ou logo após a incubação. O momento em que houve a infecção determina o padrão de mortalidade, a mortalidade inicia após 20 horas da infecção bacteriana quando essa ocorre após a incubação, quando a infecção é embrionária a mortalidade inicia já na incubação. A incidência de aves com onfalite aumenta após o nascimento e diminui após seis dias, com mortes ocasionais até três semanas de vida (HORROX, 2000).

As lesões em umbigos de pintainhos ou peruzinhos com onfalite são edema, avermelhamento e até mesmo pequenos abscessos. O abdômen apresenta-se distendido e os vasos sanguíneos estão hiperêmicos. O saco da gema apresenta-se distendido pois não ocorreu a absorção da gema, sua coloração, consistência e odor estão alterados podendo conter exsudato visível, com os vasos sanguíneos proeminentes. Pintinhos e peruzinhos que sobrevivem à onfalite podem apresentar pericardite e infecção da gema indicando a disseminação bactéria (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

A inflamação do subcutâneo que se estende abaixo da pele da ave causando a formação de placas subcutâneas fibronecróticas e o acometimento da pele adjacente é chamada de celulite. Celulite é um processo inflamatório raro em mamíferos, mas comum em aves, trata-se da principal infecção extra intestinal causada por APEC, é mais prevalente em frangos de corte e leva à condenação parcial ou total das carcaças no abatedouro (JEFFREY et al., 2002). Em perus, a doença raramente está associada à *E. coli* (CARR et al., 1996) mas principalmente com *Clostridium septicum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordelli* e *Staphylococcus aureus* (CLARK et al., 2010). *E. coli* isolados de celulite em frangos de corte no Brasil



demonstraram genes ligados ao plasmídeo CoIV e alta resistência a tetraciclina e sulfonamidas (BARBIERI et al., 2013).

O processo de celulite aguda ou subaguda que acomete os tecidos subcutâneos da região periorbital e adjacências é denominado síndrome da cabeça inchada. A doença acomete galinhas e perus, o inchaço da cabeça é causado pelo acúmulo de exsudato inflamatório abaixo da pele devido a uma resposta inflamatória. Normalmente a doença da cabeça inchada é uma infecção bacteriana, relacionada com *E. coli* após uma infecção viral do trato respiratório superior, por exemplo, causados por Metapneumovírus e Vírus da Bronquite infecciosa (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003). Altas taxas de concentração de amônia agravam a doença. Considera-se como porta de entrada a conjuntiva e as membranas mucosas dos sinus e da cavidade nasal inflamadas (DROUAL; WOOLCOCK, 1994).

*E. coli* como agente primário causador de diarreia em aves é considerado raro. No entanto, *E. coli* Enterotoxigênicas (ETEC), que produzem toxinas termo estáveis e termo-lábeis capazes de promover a acumulação de líquidos nas alças intestinais de aves, já foram isoladas de aves comerciais com diarreia (AKASHI et al., 1993; JOYA et al., 1990).

As lesões mais comuns são vistas nos cecos, as bactérias podem ser identificadas em cortes histopatológicos corados por Giemsa ou por imunohistoquímica. Em peruzinhos, infecção concomitante com o Coronavírus de perus pode levar a severo nanismo e a alta mortalidade (EDENS et al., 1997). Pakpinyo e colaboradores (2002) encontraram ETEC em 83% dos intestinos de peruzinhos que haviam sido diagnosticados com a Síndrome da Enterite e Mortalidade indicando que a bactéria pode estar associada à síndrome.

A salpingite, inflamação do oviduto, causado por *E. coli* causa queda na produção de ovos e pode culminar com mortalidade em reprodutoras. O oviduto apresenta-se distendido com as paredes adelgadas com uma ou mais massas caseosas. A massa de exsudato pode estar preenchendo toda a cavidade corporal da ave, causando peritonite, esse conteúdo normalmente contém um ovo no centro, cascas ou membranas que compõem o ovo. A extensão da infecção do oviduto para a cavidade corporal causa peritonite, mas essa pode ocorrer mesmo na ausência de salpingite quando há postura abdominal (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

A infecção ocorre quando a *E. coli* ascende da cloaca para o oviduto, a disseminação para o oviduto a partir dos sacos aéreos também pode ocorrer, porém é mais comum em aves

mais jovens que apresentam a forma septicêmica. A alta produção de ovos associado a grande concentração de estrogênio, infecção com vírus ou *Mycoplasma* predispõem à ocorrência da salpingite (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

### 3.3.2 Colisepticemia: Colibacilose Aviária Generalizada.

A presença de *E. coli* na corrente sanguínea é denominada colisepticemia. A severidade das lesões é determinada pela virulência da cepa e a eficiência da resposta imune da ave. A colisepticemia pode se manifestar como septicemia aguda, poliserosite subaguda e inflamação crônica granulomatosa. Na necropsia, normalmente a Bursa de Fabricius está atrofiada ou inflamada e é comum observar pericardite (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

Acredita-se que a principal forma de acesso das APEC à corrente sanguínea das aves seja pelo sistema respiratório. A primeira etapa para a infecção sistêmica por APEC é a colonização da traqueia e dos sacos aéreos, seguida pela colonização do fígado e saco pericárdico e subsequente bacteremia (DZIVA; STEVENS, 2008). A presença de grandes quantidades da bactéria na poeira das instalações promove a colonização dos sacos aéreos pela inalação do agente, os níveis de *E. coli* nas instalações comerciais de frangos pode alcançar  $10^2$  a  $10^5$  unidades formadoras de colônias por  $m^{-3}$  (CHINIVASAGAM et al., 2009). Outros fatores que contribuem para a colonização dos sacos aéreos são a supressão da atividade muco-ciliar no trato respiratório superior devido às infecções concomitantes ou altas taxas de amônia e a baixa vascularização e mecanismos de defesa dos sacos aéreos (FICKEN; EDWARDS; LAY, 1986).

As lesões estão principalmente no sistema respiratório, traqueia, pulmões e sacos aéreos, ocorre também o acometimento do saco pericárdico e das cavidades abdominais, caracterizando o estágio subagudo com poliserosite da doença. Os sacos aéreos acometidos ficam espessos e frequentemente possuem exsudato caseoso na superfície respiratória, caracterizando a aerossaculite (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

A via oral também é uma via de infecção e já foi demonstrada a persistência tanto de *E. coli* comensais como patogênicas no trato intestinal indicando que as fezes são importantes veiculadores de APEC (EWERS et al., 2009). A flora intestinal também possui linhagens de *E.coli* que carregam genes associados a virulência que podem ser transferidos para as APEC via transferência horizontal de genes (KEMMETT et al., 2013)

A colisepticemia com origem entérica é mais comum em perus, a bactéria chega a corrente sanguínea após danos à mucosa intestinal causados por agentes infecciosos. O agente predisponente mais comum é o Vírus da Enterite Hemorrágica. As lesões são típicas da fase aguda da colisepticemia e os animais apresentam ótima condição física, as lesões mais características são congestão ou coloração esverdeada do fígado, aumento e congestão do baço e músculos (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

A colisepticemia neonatal caracteriza-se por mortalidade elevada por 2 a 3 semanas. A maioria das aves apresenta abscessos no saco da gema, sugerindo que o umbigo seja a principal porta de entrada, no entanto, a infecção no ovo também pode ocorrer. As lesões iniciais são congestão nos pulmões, membranas serosas edemaciadas e esplenomegalia. Após alguns dias poliserosite envolvendo o saco pericárdico, pleura, sacos aéreos e peritônio tornam-se evidentes (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

### 3.4 *Escherichia coli*

*E. coli* pertence à família *Enterobacteriaceae* que é composta por organismos que podem crescer em aerobiose ou anaerobiose e utilizam fontes simples para obtenção de carbono e nitrogênio, gram negativas, não formadoras de esporos. A bactéria é a espécie mais importante do gênero *Escherichia* são bastonetes curtos, a maioria móveis através de flagelos peretríqueos e pertencem à microbiota de mamíferos e aves (FERREIRA; KNÖBL, 2009; LEE; NOLAN, 2008).

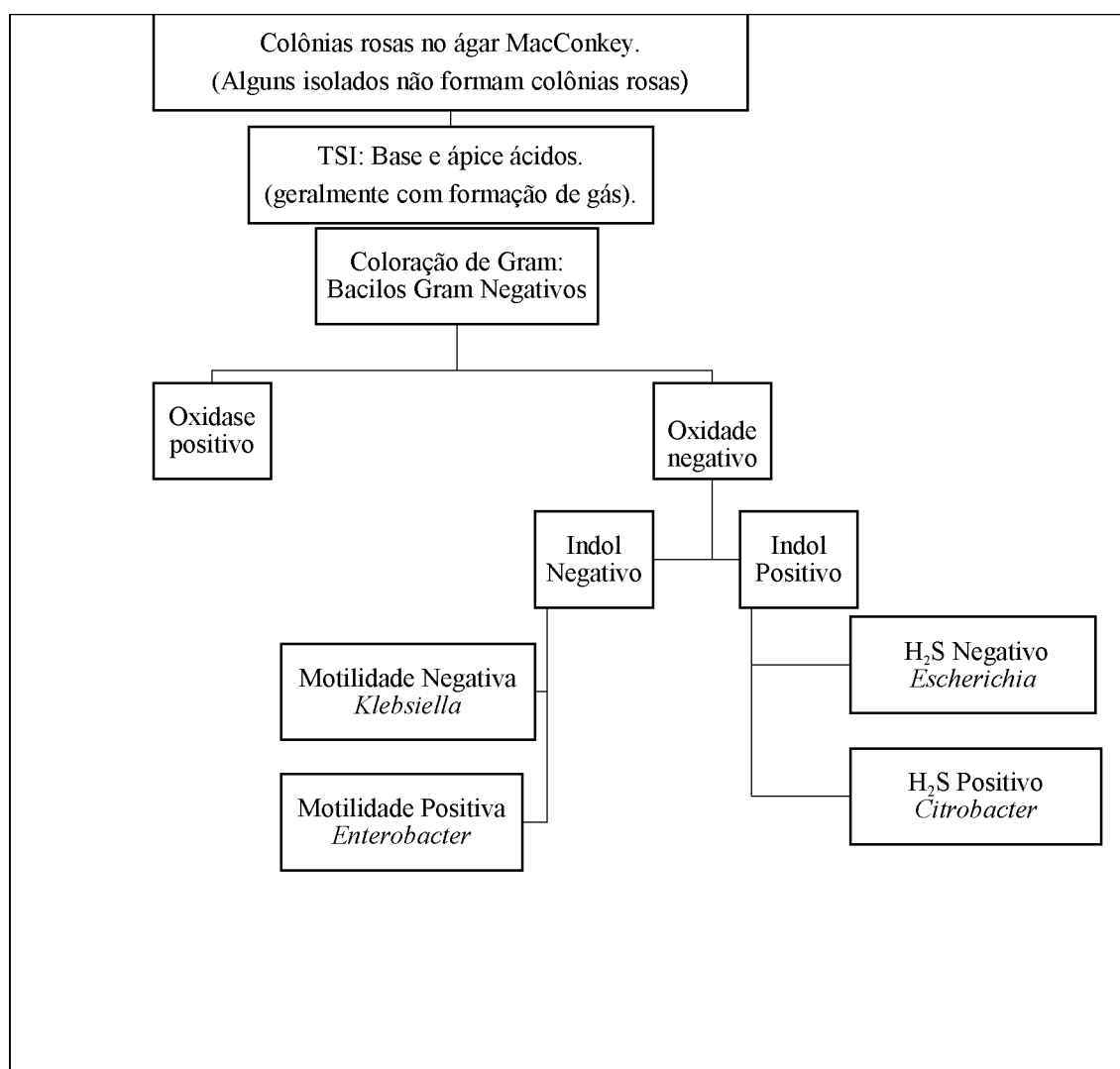
Para o isolamento, amostras de sangue devem ser diluídas na proporção de 1:10 em caldo BHI (*brain-heart infusion*) e inoculados em ágar MacConkey mas suabes ou fragmentos de órgãos com lesões também podem ser inoculados em ágar MacConkey. O ágar deve ser incubado por 18 a 24 horas a 37°C. *E. coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* fermentam a lactose do Ágar MacConkey e através dessa característica podem ser distinguidas de outras enterobactérias (LEE; NOLAN, 2008).

No ágar MacConkey a maioria das cepas de *E. coli* e alguns isolados de *Enterobacter* produzem colônias rosa (lactose positivas) de 1 a 2 mm, enquanto *Klebsiella* e *Enterobacter aerogenes* produzem colônias rosa grandes e mucoides. No entanto, é frequente o isolamento

em casos de colibacilose de *E. coli* de fermentação tardia da lactose, nesse caso as colônias no ágar MacConkey podem não demonstrar coloração rosa (LEE; NOLAN, 2008).

A identificação de *E. coli* e sua diferenciação de outras bactérias fermentadoras de lactose pode ser feita conforme o esquema apresentado na Figura 1.

Figura 1. Diferenciação de bactérias fermentadoras da lactose.



Fonte: LEE; NOLAN, 2008.

*E. coli* é um dos principais comensais do trato gastrointestinal de mamíferos e aves, nicho que colonizam poucas horas depois do nascimento do animal (SUSSMAN, 1997). Certas linhagens de *E. coli* divergem das comensais porque apresentam atributos de virulência característicos, o que lhes permite causar doença. Essas linhagens foram classificadas em patótipos conforme o sítio de ação ou o tipo de infecção que são capazes de causar (CROXEN;

FINLAY, 2010). Todos os patótipos de *E. coli* podem ser classificados em dois grandes grupos: as linhagens diarreio gênicas, que causam infecção intestinal; e as linhagens extra intestinais (ExPEC), que ocasionam um amplo espectro de doenças fora do ambiente intestinal. No grupo diarreio gênico, os patótipos são bem definidos pelas combinações distintas de fatores de virulência e são subdivididas nas classes: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasoras (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (CROXEN; FINLAY, 2010). Os patótipos extra intestinais possuem fatores de virulência e características genóticas e fenóticas muito próximas e ainda não é possível a classificação por fatores de virulência ou características biológicas. Os patótipos ExPEC podem ser divididos em *E. coli* uropatogênicas (UPEC), *E. coli* associada a meningite neonatal (NMEC), *E. coli* septicêmica (SEPEC) e o patótipo que afeta aves, *E. coli* patogênica para aves (APEC) (FERREIRA; KNÖBL, 2009; PITOUT, 2012).

As estruturas antigênicas que permitem a diferenciação sorológica de isolados de *E. coli* são os antígenos somáticos O, flagelares H e capsulares K. O antígeno somático O é o lipopolissacarídeo (LPS), um elemento termo resistente que se projeta da membrana externa para o ambiente extracelular. O lipídeo A (endotoxina), componente do LPS, é liberado durante a multiplicação ou após a morte da bactéria. A endotoxina promove a ativação de macrófagos e de mediadores da inflamação. Antígenos flagelares H são formados por compostos proteicos, mas não são utilizados com frequência na identificação antigênica das cepas de *E. coli*, e a patogenicidade da bactéria não tem sido relacionada à presença do flagelo (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

A sorotipificação foi utilizada em muitas linhas de pesquisa para identificar os sorotipos frequentemente isolados em casos de colibacilose aviária. A variação nos sorotipos é ampla, no entanto, os mais identificados são: O1, O2, O6, O8, O18, O35, O109 e O115 com destaque para O78, O1, O2, (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; JOHNSON et al., 2008a; SCHOULER et al., 2012). No Brasil, os sorotipos mais identificados foram O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119 e O152 (FERREIRA; KNÖBL, 2009). No entanto, esses grupos podem também ser isolados de fezes de animais saudáveis, o que demonstra que o trato intestinal pode ser um importante reservatório natural para as APEC e que situações de estresse podem desencadear a doença (DZIVA; STEVENS, 2008).

Outra grande variedade de sorotipos foi isolada com menor frequência, além disso, alguns isolados classificados como patogênicos não pertencem aos sorotipos conhecidos ou não são sorotipificáveis. A ampla variedade de sorotipos e a existência de isolados não sorotipificáveis torna a sorotipificação uma técnica pouco confiável para a identificação das APEC (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

### **3.5 Fatores de Virulência *Escherichia coli* patogênicas para aves (APEC)**

A colibacilose resulta em muitas perdas econômicas na atividade avícola, inicialmente, supunha-se que condições ambientais, estresse e imunidade baixa eram suficientes para a ação de bactérias oportunistas e o aparecimento da doença. Com os avanços no conhecimento do genoma da *E. coli* e das técnicas em biologia molecular foi possível identificar fatores de virulência que são essenciais para a vida extra intestinal e para a bactéria ser capaz de causar doença septicêmica (BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008; DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

Diversos estudos foram realizados na tentativa de identificar os genes que codificam fatores de virulência essenciais para a caracterização de um isolado como APEC e diferenciação de AFEC. Ewers e colaboradores (2005) utilizaram uma técnica de PCR multiplex para identificar a presença de quatro ou mais dos seguintes genes como preditores da patogenicidade de *Escherichia coli* para aves: *papC* (Fímbria P); *iucD* (aerobactina), *irp2* (proteína repressora de ferro), *tsh* (hemaglutinina termo sensível), *vat* (toxina vacuolizante), *astA* (toxina termo lábil de *E. coli* enteroagregativa), *iss* (proteína de aumento de resistência ao sistema complemento), e os operons *cva/cvi* (relacionados com o plasmídeo de colicina CoIV).

As APEC, da mesma forma que outras ExPEC possuem um vasto conjunto de genes ligados a fatores de virulência e a identificação de vários genes de virulência está associada com a patogenicidade do isolado (DHO-MOULIN, FAIRBROTHER, 1999). Segundo Pitout (2012), a presença de um fator de virulência não acarreta na virulência do micro-organismo, a combinação dos fatores e os níveis de expressão dos genes identificados irá indicar se o isolado pode ser considerado patogênico ou não. Johnson e colaboradores (2008a) identificaram um conjunto de cinco genes (*iutA*, *iss*, *iroN*, *hlyF*, *ompT*) localizados no plasmídeo CoIV considerados essenciais para a capacidade do isolado causar colibacilose, os autores sugerem o uso desses cinco genes para diferenciar APEC de AFEC.

Os fatores de virulência apresentados por APEC estão relacionados com a capacidade de aderência no trato respiratório e subsequente colonização de órgãos internos; resistência à fatores do sistema imune; capacidade de multiplicação em líquidos do hospedeiro com pouca disponibilidade de ferro e a capacidade de produzir efeitos citopáticos (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

### 3.5.1 Capacidade de aderência no trato respiratório e colonização de órgãos internos.

A adesão e colonização dos tecidos é uma etapa fundamental no estabelecimento de uma infecção bacteriana (KLEMM, 1994). Os fatores de colonização denominados adesinas são moléculas de natureza proteica que recobrem a superfície bacteriana e são capazes de reconhecer receptores específicos em células eucarióticas (SIRLICI; TRABULSI, 2005). Bactérias não patogênicas também utilizam adesinas para a fixação no trato intestinal, dessa forma, nem todas as adesinas são fatores de patogenicidade (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

Ao serem observadas pela primeira vez em microscópio eletrônico as adesinas foram chamadas de “fios”, “filamento” e “fibras”, somente posteriormente denominadas de fimbrias e também pili. Unidades de polímeros polipeptídios com uma formação central que permite a conjugação de material genético foram denominadas pili sexual (KLEMM, 1994).

As fimbrias associadas com as APEC incluem a Fímbria Tipo 1, Fímbria P, Fímbria S e F1C (KLEMM; HANCOCK; SCHEMBRI, 2010). Os diferentes tipos de adesinas podem ter ligação preferencial com diferentes tecidos no organismo (STORDEUR et al., 2002). As fimbrias Tipo 1 que se ligam a manose são comumente encontradas nas APEC, são codificadas pelo operon *fim* que codifica um filamento de 1-2 µm na superfície bacteriana, formado por várias subunidades, na extremidade mais externa da fímbria encontra-se uma lecitina que reconhece a manose e promove a aderência e colonização em células que possuem esse elemento (DZIVA; STEVENS, 2008).

A Fímbria P, codificada pelo gene *pap* está relacionada à colonização de órgãos internos causando infecção sistêmica. Em um trabalho utilizando 352 isolados comprovadamente patogênicos de *E. coli* e 108 isolados não patogênicos a Fímbria P foi identificada em 30,4% dos isolados patogênicos e em 7,4% dos isolados não patogênicos (SHOULER et al., 2012). Essa fímbria é comumente identificada em isolados UPEC de humanos e cães (RODRIGUEZ-

SIEK et al., 2005b; SMITH, FRATAMICO, GUNTHER, 2007). Em estudo em isolados de *E. coli* de aerossaculite de perus realizado no Brasil, Cunha et al. (2014) identificaram o gene *pap* em 15% dos isolados, essa porcentagem se assemelha com outro estudo realizado no Brasil (KNÖBL et al., 2012) mas difere de outros realizados na Alemanha (EWERS et al. 2004, 2007) e Estados Unidos (JOHNSON et al., 2008b; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005b). Outro trabalho com infecções experimentais demonstrou que receptores para as Fímbrias Tipo 1 são expressos no trato respiratório e receptores para as fímbrias P e S são expressos nos órgãos internos dos frangos infectados (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

A Fímbria S é uma adesina codificada pelo operon *sfa* e possui afinidade em se ligar a receptores contendo ácido siálico (KLEMM, 1994). Essa fímbria está associada às UPEC e NMEC e está associada a capacidade dessas ExPEC causarem doença extra intestinal em humanos. Já foram demonstrados isolados de APEC que possuem o gene *sfa* em casos de colibacilose de aves (DOZOIS et al., 1992). Em estudo realizado em isolados de *E. coli* em propriedades produtoras de aves do Brasil esse gene também foi localizado (KNÖBL et al., 2012).

Autotransportadores são fatores de virulência caracterizados por sua capacidade de promover a sua própria secreção através da célula bacteriana (HENDERSON; CAPPELLO; NATARO, 2000). A adesina não fimbrial denominada hemaglutinina autotransportadora termo sensível (Tsh) foi associada aos estágios iniciais de infecção, incluindo a colonização dos sacos aéreos, mas não em infecção generalizada (DOZOIS et al., 2000). Além de atuar como uma adesina o Tsh também atua como protease permitindo que a bactéria penetre profundamente nos tecidos das aves (KOSTAKIOTI; STATHOPOULOS, 2004). O Tsh também demonstrou ter atividade mucinolítica que pode ser importante para a colonização da traqueia das aves e causar colibacilose (KOBAYASHI; GAZIRI; VIDOTTO, 2010). Em estudo realizado em sacos aéreos de perus apresentando aerossaculite o gene *tsh* foi identificado em 56% dos isolados (CUNHA et al., 2014).

As invasinas, proteínas da família das adesinas, são proteínas da membrana externa que mediam a invasão das células do hospedeiro, induzindo as células eucarióticas a fagocitar a bactéria. Dentro da célula, a bactéria pode romper o vacúolo, passar para o citoplasma e se disseminar de uma célula a outra; ou permanecer no vacúolo que a transporta para o tecido subepitelial (SIRLICI; TRABULSI, 2005). A invasina IbeA está associada à alta patogenicidade em isolados de *E. coli* de aves (GERMON et al., 2005; MOULIN-



SCHOULEUR et al., 2006; VIDOTTO et al., 2007). O gene *ibeA* está localizado em uma ilha de patogenicidade denominada GimA, a proteína IbeA desempenha importante papel na invasão de ExPEC em células epiteliais microvasculares do cérebro. Estudos que promoveram a inativação do gene *ibeA* tanto em isolados NMEC quanto APEC resultaram em falhas da invasão de células epiteliais microvasculares do cérebro, tanto *in vitro* como *in vivo* (GERMON et al., 2005; WANG et al., 2012).

### 3.5.2 Resistência ao sistema imune

Os mecanismos do sistema imune atuam por ação da resposta inata ou adquirida, essas defesas são fagocitose, sistema complemento, citocinas, linfócitos e anticorpos (SIRLICK; TRABULSI, 2005). As APEC possuem capacidade reconhecida de resistir ao complemento através de vários fatores estruturais que incluem capsula K1 (antígeno capsular 1), outros tipos de cápsula, a camada de lipopolissacarídeo que recobre a bactéria, alguns tipos de proteínas de membrana externa e as proteínas TraT, Iss e OmpA (BARNES, NOLAN, VAILLANCOURT, 2008; NOLAN et al., 2003).

O antígeno capsular 1 ou cápsula K1 presente em alguns isolados de ExPEC atua recobrando a superfície bacteriana na forma de cadeias de hidrato de carbono, como um comprimento que permite formar uma barreira estereoquímica agindo contra a fixação do sistema complemento. Além disso, a baixa imunogenicidade conferida à *E. coli* pela cápsula permite que as cepas portadoras dessa capsula sejam muito resistentes à fagocitose (BIDET; BONARCORSI; BINGEN, 2012). A cápsula K1 também está associada à patogenicidade de NMEC pois desempenha papel importante na meningite neonatal, auxiliando na passagem da barreira hematoencefálica levando a bactéria às meninges (BIDET; BONARCORSI; BINGEN, 2012).

O gene *iss* responsável pela proteína Iss (*Increased serum survival*), uma lipoproteína da membrana externa que apresenta propriedades contra os efeitos líticos do soro, é apontado como essencial na patogenia das infecções por APEC, é também encontrado em cepas NMEC (NOLAN et al., 2003; EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008a). Há três alelos do gene *iss* identificados em APEC, alelo *iss* denominado tipo 1 é o mais comumente encontrado em isolados de APEC e é normalmente encontrado inserido em plasmídeos CoIV e CoIBM (JOHNSON, WANNEMUEHLER; NOLAN, 2008c). Além da comum localização em plasmídeos os genes *iss* já foram identificados no DNA cromossomal (HUJA et al., 2015). Essa proteína se localiza na membrana externa da bactéria, onde existem aproximadamente 2000

moléculas de IIS por célula bacteriana, atua prevenindo a deposição do complexo de ataque (DZIVA; STEVENS, 2008; NOLAN et al., 2003).

### 3.5.3 Obtenção de ferro

O ferro é um elemento essencial para a sobrevivência das *E. coli*, esse elemento está implicado em diversos processos intracelulares como a redução da peroxidase, transporte de elétrons e a biossíntese de nucleotídeos. Devido a concentração de ferro fora do intestino ser muito baixa, a invasão de tecidos extra-intestinais exige estratégias para o sequestro de ferro do hospedeiro para a bactéria, dessa forma, sistemas de aquisição de ferro são essenciais para o estabelecimento da colisepticemia (DZIVA; STEVENS, 2008; HUJA et al., 2015).

A forma direta de aquisição de ferro é através do ferro-heme ou de proteínas que contenham o grupo heme como a hemoglobina ou a hemopexina. Esse sistema é composto por receptores Hma e ChuA presentes nas membranas externas que se ligam ao grupo heme das heme-proteínas e transferem a molécula heme para o periplasma bacteriano, o sistema de transporte ABC leva essa molécula ao citoplasma (STOJILJKOVIC; PERKINS-BALDING, 2002).

A estratégia indireta de aquisição de ferro compreende um mecanismo de transporte, que tem como componentes pequenas moléculas quelantes de ferro chamadas de sideróforos, entre eles estão as enterobactinas, salmoquelinas, aerobactina e yersiniabactinas. O locus *iroA* responsável pela produção de salmoquelinas foi observada pela primeira vez em *Salmonella* spp. são derivados da enterobactina codificada pelo cluster gênico *iroBCDEN* (BÄUMLER et al., 1996).

As salmoquelinas, por serem superiores na aquisição de ferro a outros sideróforos na presença de albumina sérica, são consideradas mais importantes na patogênese de *E. coli* e *Salmonella* spp. do que as enterobactinas. Nos isolados de ExPEC, o cluster gênico responsável pela biossíntese e transporte das salmoquelinas é encontrado nos plasmídeos de virulência chamados CoIV e CoIBM, e também já foi associado as ilhas de patogenicidade cromossômicas de alguns isolados (STOJILJKOVIC; PERKINS-BALDING, 2002). IroN é uma salmoquelina importante, já foi identificada em diversos trabalhos e indicada como fator

essencial para a caracterização de APEC de alta virulência (JOHNSON et al., 2008a). Também foi apontado como um fator importante na virulência de isolados uropatogênicos (FELDMAN et al., 2007; RUSSO et al., 2002).

A aerobactina *iutA* foi apontada por Johnson e colaboradores (2008a) como um dos cinco fatores encontrados em *E. coli* de alta patogenicidade para aves, esse tipo de sideróforos foi encontrado em alta porcentagem de isolados classificados como virulentos em estudo com isolados de aves com colibacilose no Brasil (OLIVEIRA et al., 2015) e na Europa (SCHOUER et al., 2012).

#### 3.5.4 Produção de Toxinas

As APEC produzem menos toxinas do que as *E. coli* que acometem os mamíferos. A classificação das *E. coli* aviárias produtoras das toxinas é feita através do tipo de toxina produzida. *E. coli* Entero-hemorrágica produzem toxinas Shiga ou Shiga-like (Stx) também denominadas verotoxinas devido ao efeito que elas produzem em células vero. *E. coli* Enterotoxigênicas produzem enterotoxinas termo estáveis e termo lábeis que causam diarreia aguda, *E. coli* denominadas Entero-patogênicas e Entero-invasivas são caracterizadas pela ausência de toxinas específicas e pela sua habilidade de, respectivamente, se ligar e invadir enterócitos (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003).

A prevalência de genes que codificam toxinas como a toxina citotética distensora (*cdt*), fator necrotizante citotóxico (*cnf*) e alguns tipos de hemolisinas como *hlyA*, *hlyD* e *hlyE* tem baixa ocorrência em APEC (EWERS et al., 2007; JOHNSON et al., 2008a). Porém os genes que codificam a hemolisina aviária *hlyF* e a toxina vacuolizante *vat* são encontrados com frequência em isolados de APEC. O gene *hlyF* foi associado com isolados de alta patogenicidade e encontra-se em uma ilha de patogenicidade nos plasmídeos CoIV e CoIBM (JOHNSON; JOHNSON; NOLAN, 2006; JOHNSON et al., 2006, 2008a).

A toxina vacuolizante Vat ocorre em APEC e ExPEC humanas. Ensaios *in vitro* demonstraram que a toxina é capaz de causar lesões em células HeLA e Vero em cultura e a deleção do gene *vat* resultou na atenuação da virulência em APEC (PARREIRA; GYLES, 2003).

### 3.6 Resistência a Antimicrobianos

O sucesso no tratamento da colibacilose depende do uso de antimicrobianos capazes de debelar a infecção. O tratamento da doença normalmente é feito com o uso de beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e fenicóis antifolato como o sulfametaxazole e trimetoprim. No entanto, há um aumento significativo na resistência a antimicrobianos em isolados de APEC, entre elas cefalosporinas de terceira geração e fluoroquinolonas (GHODOUSI et al., 2015). Essa resistência pode ser transmitida para humanos através da cadeia alimentícia (JOHNSON et al., 2007; MORA et al., 2010).

A resistência a antimicrobianos ocorre quando determinado micro-organismo é capaz de resistir a concentrações ativas de determinado antimicrobiano (BOERLIN; WHITE, 2006). Bactérias resistentes a antimicrobianos são observadas desde a introdução desses medicamentos na medicina veterinária e humana, no entanto, esse fenômeno biológico vem sendo acelerado nos últimos anos (ALMEIDA; PALERMO-NETO, 2005). A resistência a antimicrobianos pode ocorrer devido às mutações genéticas que ocorrem nos cromossomos denominada resistência intrínseca ou através de transferência genética por conjugação, transformação ou transdução conhecida como resistência adquirida (WALSH, 2003).

O uso intenso de antimicrobianos leva à pressão seletiva de isolados resistentes em uma população heterogênea de bactérias. A predominância de cepas resistentes ocorre devido a eliminação de cepas suscetíveis e a multiplicação exponencial das resistentes, dessa maneira os clones resistentes geram milhões de células com o mesmo genótipo que confere resistência. Os genes podem conferir resistência cruzada, o que resulta em uma linhagem com resistência a mais de um antimicrobiano. Há ainda o fenômeno de cosseleção que ocorre quando há diferentes genes na mesma bactéria conferindo resistência a mais de um antimicrobiano (GUARDABASSI; KRUSE, 2008; KLEIN, FRANZ, 2005).

A maior parte de bactérias multirresistentes na medicina humana ocorre devido ao próprio ambiente humano, no entanto há uma forte discussão sobre o papel da criação animal na disseminação de tais bactérias (BOERLIN; WHITE, 2006). A disseminação de resistência a antimicrobianos pode ocorrer devido ao contato direto com animais (fazendeiros, trabalhadores de abatedouros), presença de resíduos de antibióticos na carne, leite, ovos e outros; ingestão de bactérias comensais selecionadas por promotores de crescimento nos animais que podem transferir a resistência a patógenos no trato gastrointestinal de humanos e

a ingestão de patógenos resistentes como por exemplo *Salmonella* spp., *E. coli* e *Campylobacter* spp. (BOERLING; WHITE, 2006; KLEIN; FRANZ, 2005; WALSH, 2003).

As fluoroquinolonas são antimicrobianos bacteriostáticos e sua atividade antibacteriana está relacionada à inibição de duas enzimas responsáveis e essenciais à replicação e transcrição do DNA bacteriano, a DNA girase e a topoisomerase IV. Essas enzimas catalisam a direção e a extensão do super-enrolamento em dupla hélice das cadeias de DNA (KENNETH; HIASA, 1997). A replicação do DNA exige que as duas cadeias se separem, ou seja, que a dupla hélice se desenrole. O grau de enrolamento depende da ação combinada das duas enzimas, a DNA girase (ou a topoisomerase II) é responsável pelo super-enrolamento negativo enquanto a topoisomerase IV remove o superenrolamento o que acarreta no relaxamento das moléculas de DNA. As fluoroquinolonas ligam-se à topoisomerase II nas bactérias Gram negativas e na Topoisomerase IV nas Gram positivas. As duas enzimas inibidas pelas fluoroquinolonas são essenciais para o crescimento e divisão da célula bacteriana, quando a ação das enzimas está bloqueada, a morte da célula bacteriana pela ação do sistema imune é facilitada (KENNETH; HIASA, 1997).

Os principais mecanismos de resistência a fluoroquinolonas se dividem em três categorias: alterações na DNA girase e topoisomerase IV, que são os sítios ativos dessas drogas, diminuição do acúmulo de antibiótico no interior da célula bacteriana por impermeabilidade da membrana e hiperexpressão de sistemas de bomba de efluxo. Esses mecanismos são mediados por genes cromossômicos (RUIZ, 2003; VILA et al., 1994).

Enrofloxacin e norfloxacin são fluoroquinolonas liberadas na medicina veterinária, extensivamente usadas na produção de aves devido ao seu amplo espectro (WEBBER, PIDDOCK, 2001). São comumente receitadas para tratamento de colibacilose via água de bebida (CAGNARDI et al., 2014). Em estudos realizados com *E. coli* na Espanha e na Itália os níveis de resistência a ciprofloxacina, metabólito ativo da enrofloxacin foram respectivamente de 91% e 88,8% (SOLÀ-GINÉS et al., 2015; GHODOUSI et al., 2015). No Brasil, em estudo de isolados de APEC proveniente de aerossaculite de perus a taxa de resistência foi bem inferior, 19% para enrofloxacin e 15,1% para norfloxacin (CUNHA et al., 2014). Barbieri e outros (2013) em estudo com isolados de *E. coli* de lesões de celulite de frangos de corte encontraram 11,8% de resistência a pelo menos uma das drogas, norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin.

Os componentes da classe dos aminoglicosídeos atuam diretamente no ribossomo bacteriano, se ligando a porção 30S, diminuindo a síntese proteica e levando à leitura incorreta do RNA mensageiro. Os mecanismos de resistência contra aminoglicosídeos são: redução da concentração da droga no interior da célula devido a ação de bombas de efluxo, alteração do alvo e inativação de enzimas como acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases (KONEMAN, 2008). Cunha e colaboradores (2014) encontraram índices de resistência de 60,4% e 19,5% para estreptomicina e gentamicina em isolados de APEC. Em estudo realizado na Espanha, valores semelhantes foram encontrados: 69% de resistência para estreptomicina e 16% para gentamicina (SOLÁ-GINÉS, 2015).

A sulfametoxazol associada ao trimetoprim tem efeito sinérgico atuando em passos distintos da síntese do ácido tetra-hidrofólico (folínico), necessário para a síntese dos ácidos nucleicos. O sulfametoxazol inibe um passo intermediário da reação e o trimetoprim a formação do metabólito ativo do ácido tetra-hidrofólico no final do processo (KONEMAN, 2008). Em estudos brasileiros com isolados de APEC, os índices de resistência a sulfonamidas foram de 94,2% e 59,7% (BARIERI et al., 2013; CUNHA et al., 2014).

Os beta-lactâmicos são antimicrobianos que se definem pela presença do anel beta-lactâmico, sendo uma classe de elevada importância na saúde veterinária e humana devido a sua excelente eficácia terapêutica e baixa toxicidade. O mecanismo de ação determinado pelo anel beta-lactâmico é a inibição da síntese do peptídeoglicano, possuem baixa toxicidade por atuarem somente na parede celular, estrutura que não ocorre nas células eucarióticas. O anel beta-lactâmico é constituído por três átomos de carbono e um de nitrogênio, podendo conter vários radicais substituintes que os tornam ativos. A família dos beta-lactâmicos é bastante heterogênea, apesar de todos possuírem o anel beta-lactâmico, a sua química não é igual podendo conter diferentes tipos de cadeias lineares, diferenciando assim as suas características, espectros de ação e resistência às beta-lactamases. Dessa forma os beta-lactâmicos podem ser divididos em quatro subfamílias: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactâmicos e ácido clavulânico (SUAREZ; GUDIOL, 2009).

Há três mecanismos de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos: presença da proteína de ligação a penicilina alterada, com baixa afinidade por beta-lactâmicos como ocorre em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina; bombas de efluxo que utilizam beta-lactâmicos como substrato, por exemplo o sistema mex encontrado em *Pseudomonas*

*aeruginosa* e por fim as enzimas denominadas beta-lactamases que inativam o anel beta-lactâmicos (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010).

*E. coli* juntamente com *Klebsiella pneumoniae* são apontadas como as principais produtoras de ESBL (*Extended-spectrum beta-lactamases*) (PITOUT; LOUPLAND, 2008). ESBL são enzimas beta-lactamases capazes de conferir resistência às penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração e ao aztreonam (não às cefamicinas e carbapenens) pela hidrólise desses antimicrobianos e que são inibidas por inibidores de beta-lactamases como o ácido clavulânico. A maioria das beta-lactamases é dividida em três tipos: TEM, SHV e CTX-M (PATERSON, 2005).

TEM-1 é a beta-lactamase mais encontrada nas bactérias Gram-negativas. Mais de 90% da resistência da *E. coli* é relacionada à produção de TEM-1. TEM-1 é capaz de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, TEM-2, a primeira derivada de TEM-1, difere do original por uma simples substituição de aminoácido, porém não capaz de alterar o perfil do substrato. TEM-3 é conhecida como a primeira beta-lactamase a apresentar o fenótipo ESBL. Mais de 90 enzimas derivadas de TEM têm sido descritas, a maioria com fenótipo ESBL (BRADDFORD, 2001; LIVERMORE, 2001). A maioria das SHV com fenótipo ESBL são caracterizadas pela substituição de uma serina por uma glicina na posição 238 (BRADDFORD, 2001). Até o presente momento são mais de 190 SHV descritas (<http://www.lahey.org/studies>).

Em meados de 1980 houve o aparecimento de uma nova classe de beta-lactamases, classificadas na família das enzimas CTX-M. A origem dos genes dessa família são os genes cromossomais das bactérias do gênero *Kluyvera* que incluem diversas espécies que vivem no ambiente sem nenhuma patogenicidade (BAUERNFEIND; GRIMM; SCHWEIGHART, 1990; MATSUMOTO et al., 1988). Atualmente, a família CTX-M é a mais abundante ESBL das *Enterobacteriaceae*, são descritos no momento 172 tipos de CTX-M (<http://www.lahey.org/studies>), que são agrupados de acordo com sua similaridade em cinco grupos: CTX-M-1, CTX-M-2; CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 (BONET, 2004).

As beta-lactamases denominadas AmpC são capazes de hidrolisar quase todos os antibióticos beta-lactâmicos incluindo: penicilinas, cefalosporinas (não as cefalosporinas de 4ª geração) e monobactâmicos e não são inibidas por inibidores de beta-lactamases como ácido clavulânico. A *E.coli* possui um gene cromossomal denominado *AmpH* que é estruturalmente similar ao AmpC, mas não é capaz de codificar enzima beta-lactamase (HANDERSON et al., 1997).

Algumas espécies que possuem genes cromossomais de AmpC são descritas na Tabela 1. Genes que codificam AmpC localizados em plasmídeos são associados à maior produção de beta-lactamases do que os genes cromossomais. A presença de um gene AmpC localizado em plasmídeo pode ser indicada quando o gene é detectado em uma espécie que não tenha uma cópia cromossomal do mesmo. Como por exemplo a localização do gene *bla*CMY-II em *E. coli* (PITOUT; LAUPLAND, 2008). O gene *bla*CMY-II é o gene AmpC localizado em plasmídeo mais comum em todo o mundo (JACOBY, 2009)

Tabela 1. Genes que codificam AmpC e a sua espécie de origem cromossomal.

Gene AmpC	Espécie de Origem
<i>cmy II</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>dha</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>fox</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
<i>acc</i>	<i>Hafnia alvei</i>
<i>act/mir</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> e <i>Enterobacter asburiae</i>
<i>cmy I/ mox</i>	<i>Aeromonas hydrophilia</i>

Fonte: PITOUT; LAUPLAND, 2008

Chama atenção o aumento de *E. coli* isoladas de aves classificadas como produtoras de ESBL e AmpC mediada por plasmídeos. A presença de genes de resistência localizados em plasmídeos, como é comum com ESBL e AmpC, facilita a transferência para outras espécies de bactérias por conjugação e, como citado anteriormente, proporciona a disseminação da resistência aos antimicrobianos (GHODOUSI et al., 2015).. Na Tabela 2, estão citados os principais trabalhos de identificação de ESBL e AmpC em isolados de *E. coli* em carcaças de aves de produção. O grupo CTX-M-1 é bastante prevalente, já os TEM e SHV estão mais restritos aos países Europeus. Entre os genes AmpC o plasmidial *cmy-II* é o único que apareceu nos resultados.

Tabela 2. Identificação de enzimas ESBL e AmpC em carcaças de aves comerciais.

Continente	País	Ano	Enzimas ESBL	Enzimas AmpC	Referências
Ásia	Japão	2004-2006		CMY-II	HIROI, et al., 2011.
	Taiwan	2002		CMY-II	YAN et al., 2004.



Europa	Dinamarca	2006, 2009-2011	CTX-M-1	CMY-II	BERGENHOLTZ et al., 2009 DANMAP 2010; DANMAP 2011; AGERSO et al., 2012. BERGENHOLTZ et al., 2009.
	França	2006	CTX-M-1, TEM-52		
	Alemanha	2011	CTX-M-1, -2, -65, TEM-52, SHV-2, -12		KOLA et al., 2012.
	Portugal	2003,2005	CTX-M-1, TEM-52, SHV-2		MACHADO et al., 2008. COHEN et al., 2012;
	Holanda	2010	CTX-M-1, -2, -14, -15, TEM-20, -52, SHV-2, -12	CMY-II	OVERDEVEST et al., 2011, EGEA et al., 2012.
	Espanha	2010	CTX-M-1-32, SHV-12		BEN SLAMA et al., 2010; JOUINI et al., 2007
África	Tunísia	2006, 2007	CTX-M-1, -8, -14, SHV-5	CMY-II	
America do Sul	Brasil, Argentina e Chile*	2008	Grupo CTX-M-2, Grupo CTX-M-8		DHANJI et al., 2010.
América do Norte	Estados Unidos	2006-2007	Grupo CTX-M-1	CMY-II	DOI et al., 2010.

\*Análises feitas pelo Reino Unido de produtos importados desses países.

Pesquisas demonstraram o papel dos chamados integrons na aquisição e disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos. Integrons são estruturas genéticas capazes de capturar e carrear genes. Eles possuem duas regiões estratégicas localizadas na região conservada 5' capazes de mobilizar e inserir ORF (fase de leitura aberta). A região variável dos integrons é constituída por um ou mais ORF, chamados cassetes gênicos. De acordo com a sequência de nucleotídeos na integrase, região que promove a integração e excisão dos cassetes gênicos, os integrons podem ser classificados em classes que vão do um ao cinco (FLUITZ; SCHMITZ, 2004; HALL; COLLIS, 1995; MARTINEZ-FEIJÓ et al., 1999). Vários trabalhos demonstraram a presença de integrons da classe 1 e 2 em *E. coli* isoladas de frangos e perus de produção, geralmente multirresistentes e associados a genes de resistência a quinolonas, aminoglicosídeos, sulfas, fenicóis, macrolídeo e genes que codificam beta-lactamases e fenicóis (KANG et al., 2005; KHAITSA et al., 2008; SOUFI et al., 2013; PICCIRILLO et al., 2014; VASILAKOPOULOU et al., 2009).

## REFERÊNCIAS

AKASHI, N.; HITOTSUBASHI, S.; YAMANAKA, H.; FUJII, Y.; TSUJI, T. MIYAMA, A.; JOYA, J.E; OKAMOTO, K. Production of heat-stable enterotoxin II by chicken clinical isolates de *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 109, n. 109, p. 311-316, 1993.

AGERSO, Y.; AARESTRUP, F.M.; PEDERSEN, K.; SEYFARTH, A.M.; STRUVE, T.; HASMAN, H. Prevalence of Extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v 67, n. 3, p. 582-588, 2012.

ALMEIDA, R.T.; PALERMO-NETO, J. Uso de antimicrobianos em avicultura e o desenvolvimento de resistência bacteriana. In: PALERMA-NETO, J. SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. (Ed.). **Farmacologia aplicada a avicultura: boas práticas no manejo de medicamentos**. São Paulo: Roca, p.161-173, 2005.

ANTAO, E.M.; GLODDE, S.; LI, G.; SHARIF R.; HOMEIER, T.; LATURNUS C.; DIEHL, I.; BETHE, A.; PHILIPP, H.C.; PREISINGER, R.; WIELER, L.H.; EWERS, C. The chicken as a natural model for extraintestinal infection caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Microbial Pathogenesis**, v.45, n.5-6, p.361-9, .2008.

BARBIERI, N.L.; OLIVEIRA, A.L.; TEJKOWSKI, T.M.; PAVANELO, D.B.; ROCHA, D.A.; MATTER, L.B.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; BRITO, G.; HORN, F. Genotypes and Pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. **PLOS ONE**, v.8, n. 8 p. 1-9, 2013.

BACK, A. Manejo sanitário de Perus. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3 p.322-327, jul. /set. 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/322.pdf>.

BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GROSS, W.B. Colibacillosis, SAIF, Y.M. (Ed.). **Diseases of Poultry**, ed.11. Iowa State University Press, Ames, IA, p. 631-652, 2003.

BARNES, H.J.; NOLAN, L.K.; VAILLANCOURT, J. P. Colibacillosis, SAIF, Y.M. (Ed.). **Diseases of Poultry**, ed.12. Iowa State University Press, Ames, IA, p. 691-737, 2008.

BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmid cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v. 18, [s.n], p. 294-298, 1990.

BÄUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; VANDER VELDEN, A.W.M.; STOJILJKOVIC, I.; ANIC, S.; HEFFRON, F. Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. **Gene**, v. 183, n. 1-2, p. 207-213, 1996.

BEN SLAMA, K.; JOUINI, A.; BEN SALLEM, R.; SOMALO, S.; SÁENZ, Y.; ESTEPA, V.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Prevalence of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates in food samples in Tunisia, and characterization of integrons and antimicrobial resistance mechanisms implicated. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 281-286, 2010.

BERGENHOLTZ, R.D.; JORGENSEN, M.S.; HANSEN, L.H.; JENSEN, L.B.; HASMAN, H. Characterization of genetic determinants of Extended-spectrum cephalosporinases (ESCs) in *Escherichia coli* isolates from Danish and imported poultry meat. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 207-209, 2009.

BIDET, P.; BONARCOSI, S.; BINGEN, E. Virulence factors and pathophysiology of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Arquivos de Pèdiatrie**, v. 19, n. 3, p. 580-592, 2012.

BOERLIN, P.; WHITE, D.G. Antimicrobial resistance and its epidemiology. In: GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J.J.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. (Eds.). **Antimicrobial Therapy in veterinary**. 4<sup>th</sup> ed. Ames, Iowa, Blackwell Publishing p. 626, 2006.

BONNET, R. Growing group of Extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.

BRASIL 2013, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2013, [http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif\\_cons](http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif_cons).

CARR, D.; SHAW, D.; HALVORSON, D.A.; RINGS, B.; ROEPKE, D. Expressive mortality in Market-age turkeys associated with cellulitis. **Avian Diseases**, v. 40, n.3p. 736-741, 1996.

CAGNARDI, P.; FERRARESI, C.; LUCATELLO, L.; MEUCCI, V.; INTORRE, L.; GRILLI, G.; PICCIRILLO, A.; GIACOMELLI, M.; MONTESISSA, C. Enrofloxacin against *Escherichia coli* in turkeys: which treatment scheme is effective? **Poultry Science**, v. 93, n. 7, pp. 1667-1674, 2014.

CHINIVASAGAM, H.N.; TRAN, T.; MADDOCK, L.; GALE, A.; BLACKALL, P.J. Mechanically ventilated broiler sheds: a possible source of aerosolized *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v.75, n.23, pp 1380-1389, 2009.

CLARK, S.; PORTER, R.; MCCOMB, B.; LIPPER, R.; OLSON, S.; NOHNER, S.; SHIVAPRASAD, H.L. Clostridial dermatitis and cellulitis: an emerging disease of turkeys. **Avian Disease**, v.54, n. 2, p. 788-794, 2010

COHEN STUART, J.; VANDEN MUNCKHOF, T.; VOETS, G.; SCHARRINGA, J.; FLUIT, A.; HALL, M.L. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 212-214, 2012.

COSTA, F. **Caracterização do processo de rigor mortis e da maciez dos músculos Gastrocnemius e Pectoralis e efeito da radiação gama na vida comercial da carne de peru (*Meleagris gallopavo*)**. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamentos Tecnológico de Produtos de Origem animal) Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

COLLINGWOOD, C.; KEMMETT, K.; WILLIAMS, N.; WIGLEY, P. Is the concept of avian pathogenic *Escherichia coli* as a single pathotype fundamentally flawed? **Frontiers in Veterinary Science**, v. 1, p. 1-4, 2014.

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

CUNHA, M.P.V.; XAVIER DE OLIVEIRA, M.G.; VILELA DE OLIVEIRA, M.C.; SILVA, C.K.; GOMES, C.R.; MORENO, A.M.; KNOBL, T. Virulence profiles, phylogenetic background, and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from turkeys with aerosacculitis. **The Scientific World Journal**, v. 2014, [s.n], 2014.

DANMAP 2010. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. [www.danmap.org](http://www.danmap.org). 2010.

DANMAP 2011. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. [www.danmap.org](http://www.danmap.org). 2011.

DHANJI, H.; MURPHY, N.M.; DOUMITH, M.; DURMUS, S.; LEE, S.S.; HOPE, R.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D.M. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2534-2537, 2010.

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

DOI, Y.; PATERSON, D.L.; EGEA, P.; PASCUAL, A.; LÓPEZ-CERERO, L.; NAVARRO, M.D.; ADAMS-HADUCH, J.M.; QURESHI, Z.A.; SIDJABAT, H.E.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J. Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 1, p. 33-38, 2010.

DOZOIS, C. M.; FAIRBROTHER, J.M.; HAREL, J.; BOSSE, M. Pap and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 7, p. 2648-2656, 1992.

DOZOIS, C.M.; DHOMOULIN, M.; BREE, A.; FAIRBROTHER, J.M.; DESAUTELS, C.; CURTIS III, R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7 p. 4145-4154, 2000.

DROUAL, R.; WOOLCOCK, P. Swollen head syndrome associated with *E.coli* and infectious bronchitis virus in the central valley of California. **Avian Pathology**, v.23, n.4 p. 733-742, 1994.

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.

EDENS, F.; PARKHURST, C.R.; QURESHI, M.A.; CASAS, I. A.; HAVENSTEIN, B. Atypical *Escherichia coli* strains and their association with poult enteritis and mortality syndrome. **Poultry Science**, v. 76, n.7 p. 952-960, 1997.

EGEA, P.; LOPEZ-CERERO, L.; TORRES, E.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, M.C.; SERRANO, L.; NAVARRO SANCHEZ-ORTIZ, M.D.; RODRIGUEZ-BAÑO, J.; PASCUAL, A. Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 2, p. 69-73, 2012.

EWERS, C.; JANßEN, T.; KIEßLING, S.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 104, n. 1-2, p. 91-101, 2004.

EWERS, C.; JANßEN, T.; KIEßLING, S.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Rapid detection of virulence associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, v.49,[s.n], pp. 269-273, 2005.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIEßLING, S.; ALT, K.; ANTAO, E. M.; LATURNUS, C.; DIEHL, L.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BOHNKE, U.; STERNRUCK, H.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli* how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 3 p. 163-176, 2007.

EWERS, C.; ANTAO, E. M.; DIEHL, I.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Intestine and environment of the chicken as reservoir for extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p.184-192, 2009.

FALLAVENA, L.C.B.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P; DA SILVA, A.B.; VARGAS, R.S.; DO NASCIMENTO, V.P.; CANAL, C.W. Diagnosis of Skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses –A microscopic and macroscopic study. **Avian Pathology**, v. 29, p. 557-562, 2000.

FELDMANN, F.; SORSA, L.J.; HILDINGER, K.; SCHUBERT, S. The Salmochelin Siderophore Receptor IroN Contributes to Invasion of Urothelial Cells by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* In Vitro. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 6, pp. 3183-3187, 2007.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. In: JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. Doenças das aves. Campinas: FACTA, 2009. cap. 4, p. 457-474.

FICKEN, M.D.; EDWARDS, J.F, LAY, J.C. Induction, collection, and partial Characterization of induced respiratory macrophages of the turkey. **Avian Diseases**, v. 30, n.4 p. 766-777., 1986

FLUITZ, A.C.; SCHMITZ, F.J. Resistance integrons and super integrons. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, p. 278-288, 2004.

GERMON, P.; CHEN, Y.H.; HE, L.; BLANCO, J.E.; BRÉE, A.; SHOULER, C.; HUANG, S.H.; MOULIN-SHOULEUR, M. *ibe A*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 151, n. 4 p. 1179-1186, 2005.

GHODOUSI, A.; BONURA, C.; DI NOTO, A.M.; MAMMINA, C. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC- producing, and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in retail broiler chicken meat, Italy. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 7, 2015.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. (Ed.). **Guide to antimicrobial use in animals**. Ames: Iowa Blackwell Publishing, p.1-12, 2008.

HALL, R.M.; COLLIS, C.M. Mobile genes cassetts and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. **Molecular Microbiology**, v.15, [s.n], p. 593-600, 1995.

HENDERSON, T.A.; YOUNG, K.D.; DENOME, S. A.; ELF, P.K. AmpC and AmpH, proteins related to the class C  $\beta$ -lactamases, bind penicillin and contribute to the normal morphology of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 6112-6121, 1997.

HENDERSON, I.R.; CAPPELLO, R.; NATARO, J.P. Autotransporter proteins, evolution and redefining protein secretion. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 529-532, 2000.

HIROI, M.; HARADA,T.; KAWAMORI, F.; TAKAHASHI, N.; KANDA, T.; SUGIYAMA, K.; MASUDA, T.; YOSHIKAWA,Y.; OHASHI,N. A survey of beta-lactamase producing *Escherichia coli* in farm animals and raw retail meat in Shizuoka Prefecture, Japan. **Japanese Journal of Infectious Disease**, v. 64, n. 2, p. 153-155, 2011.

HORROX, N. Controlling yolk sac Infection. **International Hatchery Practice**, v. 14, p. 27-28, 2000.

HUJA, S.; OREN, Y.; TROST, E.; BRZUSZKIEWICZ, E.; BIRAN, D.; BLOM, J.; GOESMANN, A.; GOTTSCHALK, G.; HACKER, J.; RON, E. Z.; DOBRINDT, U. Genomic Avenue to Avian Colisepticemia. **mBio**, v. 6, n. 1, p.1-13, 2015.

JACOBY, G.A. AmpC beta-lactamase. **Clinical Microbiology Review**, v. 22, n. 1 p. 161-168, 2009.

JAKOBSEN, P.; GARNEAU, G.; BRUAT, G.; HAREL, J.; OLSEN, S.S.; PORSBO, L.J.; HAMMERUM, A.M.; FRIMODT-MOLLER, N. Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat? **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 1121-1129, 2012.

JEFFREY, J.S; NOLAN, L.K.; TONOOKA, K.H.; WOLFE, S.; GIDDINGS, C.W. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulites or colisepticemia lesion in chickens. **Avian Diseases**, v.46, n.1 p. 48-52, 2002.

JOHNSON, T.J.; SKYBERG, J.; NOLAN, L.K. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian Colibacillosis. **Avian Diseases**, v. 48, n. 2, p. 351-360, 2004.

JOHNSON, T.J.; SIEK, K.E.; JOHNSON, S.J.; NOLAN, L.K. DNA sequence of a CoIV plasmid and prevalence of selected plasmid encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2 p. 745-758, 2006.

JOHNSON, T.J.; JOHNSON, S.J.; NOLAN, L.K. Complete DNA sequence of a CoIBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related CoIV virulence plasmids. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 16, p. 5975-5983, 2006.

JOHNSON, J.R.; SANNES, M.R.; CROY, C.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C.; KUSKOWISKI, M.A.; BENDER, J.; SMITH, K.E.; WINOKUR, P.L.; BELONGIA, E.A. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. **Emerging Infectious Disease**, v. 13, n. 1, p. 838-846, 2007.



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

JOHNSON, T.J.; WANNEMUEHLER, Y.; JOHNSON, S.J.; STELL, A.L.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, J.R.; KIM, K.S.; SPANJAARD, L.; NOLAN, L.K. Comparison of extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 22. p. 7043-7050, 2008b.

JOHNSON, T.J.; WANNEMUEHLER, Y.; NOLAN, L.K. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n. 8, p. 2360-2369, 2008c.

JOUINI, A.; VINUE, L.; SLAMA, K.B.; SÁENZ, Y.; KLIBI, N.; HAMMAMI, S.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Characterization of CTX-M and SHV Extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 1137-41, 2007.

JOYA, J.E.; TSUJI, T.; JACALNE, A.V.; ARITA, M.; TSUKAMOTO, T.; HONDA, T.; MIWATANI, T. Demonstration of enterotoxigenic *Escherichia coli* in diarrheic broiler chicks. **European Journal of Epidemiology**, v. 6, n. 1 p. 88-90, 1990

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 Therapy**, v. 55, n. 5, p. 639-644, 2005.

KENNETH, J.M.; HIASA, H. Mechanism of quinolone action: a drug induced structural perturbation of the DNA precedes strand cleavage by topoisomerase IV. **The journal of biological chemistry**, v. 272, p. 9101-9104, 1997.

KEMMETT, K.; HUMPHREY, T.; RUSHTON, S.; CLOSE, A.; WIGLEY, P.; WILLIAMS, N.J. A longitudinal study simultaneously exploring the carriage of APEC virulence associated genes and the molecular epidemiology of faecal and systemic *E. coli* in commercial broiler chickens. **PLoS One**, v. 8, 6e67749, 2013

KHAITSA, M.L.; OLOYA, J.; DOETKOTT, D.; KEGODE, R. Antimicrobial resistance and association with class 1 integrons in *Escherichia coli* isolated from turkey meat products. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 8, p. 1679-1684, 2008.

KLEIN, G.; FRANZ, C.M.A.P. The farm animal as potential reservoir of antibiotic resistant bacteria in the food chain. In: HOLZAPFEL, W.H.; NAUGHTON, P.J. (Ed.). **Microbial ecology in growing animals**. Elsevier Ltd, 2005, p.191-207.

KLEMM, P. **Fimbriae: Adhesion, Genetics, and Vaccines**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994, 283p.

KLEMM, P.; HANCOCK, V.; SCHEMBRI, M.A. Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 5, p. 628-640, 2010.

KNÖBL, T.; MORENO, A. M.; PAIXÃO, R.; GOMES T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; LEITE, D.S.; BLANCO, J.E. Prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) clone harboring *sfa* gene in Brazil. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 437-442, 2012.

KOBAYASHI, R.K.T.; GAZIRI, L.C.J.; VIDOTTO, M.C. Functional activities of the Tsh protein from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains. **Journal of Veterinary Science**, v. 11, n. 4, p.315, 2010.

KOLA, A.; KOHLER, C.; PFEIFER, C.; SCHWAB, F.; KÜHN, K.; SCHULZ, K.; BALAU, V.; BREITBACH, K.; BAST, A.; WITTE, W.; GASTMEIER, P.; STEINMETZ, I. High prevalence of Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in organic and conventional retail chicken meat, Germany. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2631-2634, 2012.

KONEMAN, A. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOSTAKIOTI, M.; STATHOPOULOS, C. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strains. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5548-5554, 2004.

LEE, M.D; NOLAN, L.K. Colibacillosis. In: ZAVALA, L.D.; SWAYNE, D.E.; GLISSON, J.R.; PEARSON, J.E.; REED, W.M.; JACKWOOD, M.W.; WOOLCOCK, P.R. **A**

**laboratory manual for the isolation, Identification and Characterization of avian pathogens.** American Association of avian Pathologists, 2008. cap.3, p.10-11.

LI, G., LATURNUS, C., EWERS, C. WIELER, L.H. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 5 p. 2818-2827, 2005.

LIVERMORE, D.M.; OAKTON, K.J.; CARTER, M.W.; WARNER, M. Activity of ertapenem (MK 0826) versus Enterobacteriaceae with potent  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial agents and Chemoterapy**, v. 45, n. 10, p. 2831-2837, 2001.

MACHADO, E.; COQUE, T.M.; CANTON, R.; SOUSA, J.C.; PEIXE, L. Antibiotic resistance integrons and Extended-spectrum {beta}-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 2, p. 296-302, 2008.

MANGES, A.R.; JOHNSON, J.R. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, p. 712-719, 2012.

MARTINEZ-FREIJO, P.; FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J.; VERHOEF, J.; JONES, M.E. Many classes I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe. **Agents Chemotherapy**, v. 43, [s.n], p.686-689, 1999.

MATSUMOTO, Y.; IKEDA, F.; KAMIMURA, T.; YOKOTA, Y.; MINE, Novel Plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxymino cephalosporins. **Antimicrobials Agents Chemotherapy**, v. 32, n. 8, p. 1243-1246, 1988.

MOKADY, D.; GOPHNA, U.; RON, E.Z. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43,n.1, p 63-73, 2005.

MORA, A.; HERRERA, A.; MAMANI, R.; LÓPEZ, C.; ALONSO, M.P.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; GARCÍA-GARROTE, F.; PITA, J.M.; COIRA, A.; BERNÁRDEZ, M.I.; BLANCO, J. Recent emergence of clonal group O25b.K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9- producing strains, and comparison with clinical human isolates. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 26, p. 6991-6997, 2010.

MOULIN- SCHOULEUR, M.; SCHOULER, C.; TAILLIEZ, P.; KAO, M.R.; BRÉE, A.; GERMON, P.; OSWALD, E.; MAINIL, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J. Common virulence factors and genetic relationship between O18: K1:H7 *Escherichia coli* isolated of human and avian origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3484-3492, 2006.

NOLAN, L.K.; HOME, S.M.; GIDDINGS, C.W.; FOLEY, S.L.; JOHNSON, T.J.; LYNNE, A.M.; SKYBERG, J. Resistance to serum complement, iss, and virulence of Avian *Escherichia coli*. **Veterinary Research Communication**, v. 27, n. 2, p. 101-110, 2003.

OLIVEIRA, A.L.; ROCHA, D.A.; FINKLER, F.; BRUNELLI DE MORAES, L.; BARBIERI, N.L.; PAVANELO, D.B.; WINKLER, C.; GRASSOTTI, T.T.; TAGLIARI DE BRITO, K.C.; GUIMARÃES DE BRITO, B.; HORN, F. Prevalence of CoIV plasmid-linked genes and *in vivo* pathogenicity of avian strains of *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.12, n.8, pp.679-685, 2015.

OLSEN, R.H.; FRANTZEN, C.; CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. An investigation of first-week mortality in layers. **Avian Diseases**, v.56, n.1, p.51-57, 2012.

OVERDEVEST, I.; WILLEMSSEN, I.; RIJNSBURGER, M.; EUSTACE, A.; XU, L.; HAWKEY, P.; HECK, M.; SVELKOU, P.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; VAN DER ZWALUW, K.; HUIJSDENS, X.; KLUYTMANS, J. Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1216-22, 2011.

PAKPINYO, S.; LEY, D.H.; BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GUY, J.S. Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in naturally occurring cases of poult enteritis-mortality syndrome. **Avian Diseases**, v.46, n. 2, p.360-9, 2002.

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

PASS M.A.; ODEDRA, R.; BATT, R.M. Multiplex PCRs for Identification of *Escherichia coli* virulence genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5 p. 2001-2004, 2000.

PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v.6, n.300, 2010.

PICCIRILLO, A.; GIOVANARDI, D.; DOTTO, G.; GRILLI G.; MONTESISSA, C.; BOLDRIN, C.; SALATA, C.; GIACOMELLI, M. Antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* from meat turkeys in Northern Italy. **Avian Pathology**, v. 43, n. 5, p. 396-405, 2014.

PITOUT, J.D.D.; LAUPLAND, K. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **Lancet Infectious Diseases**, v. 8, [s.n], p. 159-166, 2008.

PITOUT, J.D.D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence and antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 9, 2012.

POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone-resistance; Interactions between human, animal, and environmental ecologies. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 24, 2012.

RODRIGUEZ-SIEK, K.E; GIDDINGS, C.W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T.J.; NOLAN, L.K. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, v. 36, n. 2, p. 241-256, 2005a.

RODRIGUEZ-SIEK, K.E; GIDDINGS, C.W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T.J.; FAKHR, M.K.; NOLAN, L.K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v. 151, n. 6, p.2097-2110, 2005b.

RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1109-1117, 2003.

RUSSO, T.A.; MCFADDEN, C.D.; CARLINO-MACDONALD, U.B.; BEANAN, J.M.; BARNARD, T.J.; JOHNSON, J.R. *IroN* functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 7156-7160, 2002.

SAVAGLIA, F. Liderança Mundial. **Revista Nacional da Carne**, n. 385, p. 38-48, 2009.

SCHOULER, C.; SCHAEFFER, B.; BRÉE, A.; MORA, A.; DAHBI, G.; BIET, F.; OSWALD, E.; MAINIL, J.; BLANCO, J.; MOULIN-SCHOULEUR, M. Diagnostic Strategy for Identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n. 5, p. 1673-1678, 2012.

SIRLICI, M.P.; TRABULSI, L.R. Fatores de virulência: adesão, invasão, sideróforos, evasinas. In: TRABULSI, L.R.; ALTHERTUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4<sup>a</sup>.ed. São Paulo. Atheneu, 2005, p. 143-156.

SMITH, J.L.; FRATAMICO, P.M.; GUNTHER, N.W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 134-163, 2007.

SOLÀ-GINÉS, M.; CAMERON-VEAS, K.; BADIOLA, I.; DOLZ, R.; MAJÓ, N.; DAHBI, G.; VISO, S.; MORA, A.; BLANCO, J.; PIEDRA-CARRASCO, N.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.J.; MIGURA-GARCIA, L. Diversity of Multi-Drug Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causing outbreaks of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain. **PLOS One**, v. 10, n. 11, p.1-14, 2015.

STOJILJKOVIC, I.; PERKINS-BALDING, D. Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria. **DNA Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 281-295, 2002.

STORDEUR, P.; MARLIER, D.; BLANCO, J.; OSWALD, E.; BIET, F.; DHO-MOULIN, M.; MAINIL, J. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesion genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E.coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 231-241, 2002.

SOUFI, L.; SÁENZ, Y.; VINUÉ, L.; ABBASSI, M.S.; HAMMAMI, S.; TORRES, C. Characterization of Pc promoter variants of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from poultry meat. **Foodborn Pathogens and Disease**, v. 10, n. 12, p.1075-1077, 2013.

SUAREZ, C.; GUDIOL, F. B Beta-lactam antibiotics. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica**, v. 27, p. 116-129, 2009.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

UBABEF (União Brasileira de Proteína Animal). Relatório Anual 2015. Capturado em 09 de fevereiro de 2016. Online disponível na internet: [http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual\\_UBABEF\\_2015\\_DIGITAL.pdf](http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf)

VASILAKOPOULOU, A.; PSICHOGIOU, M.; TZOUVELEKIS, L.; TASSIOS, P.T.; KOSMIDIS, C.; PETRIKKOS, G.; ROMA, E.S.; CHARVALOS, E.; PASSIOTOU, M.; AVLAMI, A.; DAIKOS, G. L. Prevalence and characterization of class 1 integrons in *Escherichia coli* in poultry and human origin. **Foodborn Pathogens and Disease**, v. 6, n. 10, p. 1211-1218, 2009.

VANDEKERCHOVE, D.; DE HERDT, P.; LAESENS, H. PASMANS, F. Colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the etiological agent. **Avian Pathology**, v.33, n.2, p.117-125, 2004.

VIDOTTO, M.C.; QUEIROZ, M.B.; DE LIMA, N.C.; GAZINI, L.C. Prevalence of *ibeA* gene in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 88-89, 2007.

VILA, J.; RUIZ, J.; MARCO, F.; BARCELÓ, A.; GOÑI, P.; GIRALT, E.; GIMENIZ DE ANTA, T. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and minimal inhibitory concentration. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 2477-2479, 1994.

VINCENT, C.; BOERLIN, P.; DAIGNAULT, D.; DOZOIS, C.M.; DUTIL, L.; GALANAKIS, C.; REID-SMITH, R.J. TELLIER, P.P.; TELLIS, P.A.; ZIEBELL, K. MANGES, A.R. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 88-95, 2010.

WALSH, C. Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington, DC: ASM Press, 2003.

WANG, S.; SHI, Z.; XIA, Y.; LI, H.; KOU, Y.; BAO, Y.; DAI, J.; LU, C. *IbeB* is involved in the invasion and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 3-4, p. 411-419, 2012.

WEBBER, M.; PIDDOCK, J.V. Quinolone Resistance in *Escherichia coli*. **Veterinary Research**, v. 32, [sn], p. 275-284, 2001.

YAN, J.J.; HONG, C.Y.; KO, W.C.; CHEN, Y.J.; TSAI, S.H.; CHUANG, C.L.; WU, J.J. Dissemination of *bla*CMY-2 among *Escherichia coli* isolates from food animals, retail ground meats, and humans in southern Taiwan. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1353-1356, 2004.



## **CAPÍTULO 2**

### **Caracterização de *Escherichia coli* isoladas de perus no Brasil**

Artigo a ser publicado no periódico

**Brazilian Journal of Microbiology**

### Caracterização de *Escherichia coli* isoladas de perus no Brasil

HOEPERS<sup>1</sup>, Patrícia Giovana, SILVA, Paulo Lourenço<sup>1</sup>, ROSSI, Daise Aparecida<sup>1</sup>, VALADARES JÚNIOR, Edson Campos<sup>1</sup>, FERREIRA, Bruna Custódio<sup>1</sup>, ZUFFO, João Paulo<sup>2</sup>, KOERICH, Priscilla Karina<sup>3</sup>, FONSECA, Belchiolina Beatriz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Rua Ceará S/N, Campus Umuarama, Bloco 2D, Sala 43, CEP: 38402-018. Uberlândia-MG.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC), Av. Luis de Camões, Conta Dinheiro, CEP: 88520-000, Lages -SC

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite, 521, CEP 90050170, Porto Alegre-RS.

E- mail: phoepers@yahoo.com.br

**ABSTRACT-** Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) causes colibacillosis in poultry and huge economic loss to the poultry industry. Contamination of food with *E. coli* isolates containing genes associated with virulence factors and antimicrobial resistance is a concern to human health. Studies have shown the similarity of APEC with human ExPEC and antimicrobial resistance genes may be linked to the emergence of multidrug resistant (MDR) bacteria in human communities. The aim of this study was to characterize 364 *E. coli* isolates of turkeys suspected of colibacillosis from four major turkeys producing states in Brazil. The results showed that 84.3% of the isolates harbored four or five genes associated to the plasmid ColIV and though were characterized as APEC. The selected isolates for phylogenetic classification belong mainly to B1 and D groups. In the antibiogram test, 82.14% of isolates were considered MDR (multidrug resistant); the highest rates of resistance were against erythromycin (99%) and amoxicillin (76.1%). All isolates that showed resistant or intermediate pattern for ceftiofur in antibiogram were positive for ESBL (beta-lactamases of extended spectrum) or pAmpC (plasmid-associated cephalosporinases) genes. Genes associated with ESBL were 79.4% positive for *bla*CTX-M-2 and 20.59% for *bla*CTX-M-8 / 25. All isolates positive for pAmpC gene were *bla*CMY II. The State of Goiás was responsible for most of the isolates resistant to ceftiofur and was the only State where *bla*CMY-II genes have been identified. This study shows high prevalence of APEC in suspected cases of colibacillosis in turkeys, high

antimicrobial resistance index and alert for resistance to ceftiofur and the presence of *E. coli* ESBL and pAmpC in the turkeys' production chain.

Keywords: APEC, ESBL, AmpC, Poultry

**RESUMO** - *Avian Pathogenic E. coli* (APEC) causam colibacilose em aves de produção e prejuízos consideráveis para a indústria avícola. A contaminação de alimentos com isolados de *E. coli* contendo genes associados a fatores de virulência e resistência a antimicrobianos é motivo de preocupação para a saúde pública. Estudos demonstraram a semelhança de APEC com ExPEC humanas e os genes de resistência a antimicrobianos podem favorecer o aparecimento de isolados *multidrug resistant* (MDR) nas comunidades humanas. Objetivou-se caracterizar 364 isolados de *E. coli* de casos suspeitos de colibacilose de quatro dos principais estados produtores de perus do Brasil. Os resultados mostraram 84,3% dos isolados com quatro e cinco genes associados ao plasmídeo CoIV sendo caracterizados como APEC. Os isolados selecionados para classificação filogenética pertencem principalmente aos grupos B1 e D. Um total de 82,14% de isolados foram considerados MDR, os maiores índices de resistência foram para eritromicina (99%) e amoxicilina (76,1%). Os 43 isolados que foram resistentes ou intermediários para ceftiofur no antibiograma foram positivos para ESBL (beta-lactamases de espectro estendido) ou pAmpC (cefalosporinases mediadas por plasmídeo). Dos genes associados a ESBL 79,4% foram positivos para blaCTX-M-2 e 20,59% para blaCTX-M-8/25. Os nove isolados pAmpC foram positivos para blaCMY-II. O estado de Goiás foi responsável pela maioria dos isolados resistentes para ceftiofur e foi o único estado onde genes blaCMY-II foram identificados. Esse estudo demonstra a alta prevalência de APEC em isolados de casos suspeitos de colibacilose em perus, alto índice de resistência a antimicrobianos e alerta para a resistência a ceftiofur e a presença de *E. coli* ESBL e pAmpC na cadeia produtiva de perus.

Palavras-chave: APEC, ESBL, AmpC, Aves

## INTRODUÇÃO

*Avian Pathogenic E. coli* (APEC) é uma representante da classe *Extraintestinal Pathogenic E. coli* (ExPEC) assim como a *Uropathogenic E. coli* (UPEC) e *Neonatal Meningitis E. coli* (NMEC) (Russo; Johnson, 2000). As infecções extra intestinais causadas por APEC são denominadas colibacilose. As manifestações mais comuns da colibacilose em perus são aerossaculite, peri-hepatite, pericardite e septicemia. Em perus jovens APEC está associada a doença chamada TOC (*Turkey osteomyelitis complex*) que causa vários tipos de lesões incluindo artrite e sinovite, infecção de tecidos moles, descoloração esverdeada do fígado e osteomielite da tíbia proximal (Barnes; Vaillancourt; Gross, 2003; Dziva; Stevens, 2008). O impacto econômico da doença é notável no Brasil, país que ocupa o segundo lugar na produção mundial de carne de aves (Fallavena et al., 2000; UBABEF, 2015) as perdas econômicas são resultado de prejuízo devido a mortalidade, queda na produção de carne e ovos, aumento do gasto com antimicrobianos e condenações no abatedouro.

Diversos fatores de virulência já foram identificados em APEC indicando grande diversidade genotípica e fenotípica dos isolados (Stordeur et al., 2002; Li; Ewers; Wieler, 2005; Johnson et al., 2006). Na tentativa de identificar isolados de APEC diferenciando-os de AFEC (*Avian Fecal E. coli*) alguns conjuntos de genes foram propostos pois codificam fatores de virulência que permitem o estilo de vida extra intestinal da *E. coli* (Pass; Odedra; Batt, 2000; Ewers et al., 2005; Johnson et al., 2008; Schouler et al., 2012). Os genes *intA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT* associados aos plasmídeos CoIV, foram testados e foram capazes de identificar com sucesso isolados APEC e AFEC anteriormente caracterizados (Johnson et al., 2008).

O potencial zoonótico de isolados de APEC tem sido sugerido após estudos terem demonstrado a similaridade de ExPEC de origem humana com APEC (Ewers et al., 2007; Johnson et al., 2007; Moulin-Schouleur et al., 2006). A preocupação com isolados APEC na saúde pública também está associada a resistência a antimicrobianos. Diversos estudos indicaram a alta frequência de isolados multirresistentes a antimicrobianos em APEC (Johnson et al., 2004; Cunha et al., 2014; Sólá-Ginés et al., 2015). Além do potencial zoonótico, isolados APEC podem servir como reservatório de genes de virulência e resistência a antimicrobianos para bactérias patogênicas para humanos, já que boa parte desses genes se localizam em plasmídeos, elementos genéticos móveis de fácil disseminação (Rodriguez-Siek et al., 2005).

Isolados de *E. coli* de carcaça de frangos, fezes e carne de frango já foram identificados como portadores de genes que codificam beta-lactamases, ESBL (beta-lactamases de espectro estendido) e pAmpC (cefalosporinases mediadas por plasmídeo) (Costa et al., 2009; Cohen Stuart et al., 2010; Ghodousi et al., 2015). Em humanos, isolados produtores de beta-lactamases são associados com infecções localizadas ou sistêmicas. Além disso, *E. coli* também são importantes causas de infecções do trato urinário e entérico, as infecções sistêmicas incluem pneumonias nasocomiais, peritonite, colangites, celulite, osteomielite e artrite, são também as principais responsáveis pela meningite neonatal (Mandell et al., 2005).

Alguns estudos realizados no Brasil já verificaram a presença de genes de virulência e resistência a antimicrobianos em isolados de *E. coli* de aves de produção (Barbieri et al., 2013; Cunha et al., 2014; Oliveira et al., 2015). No entanto, a amostragem dessas pesquisas não contempla importantes regiões de produção e não há pesquisa de genes relacionados à beta-lactamases em isolados de órgãos de perus.

Objetivou-se identificar isolados de APEC isolados de perus apresentando doença sugestiva de colibacilose em quatro estados brasileiros, na região sul, sudeste e centro-oeste do país, identificar o perfil de resistência a antimicrobianos e verificar a presença de enzimas beta-lactamases, ESBL, pAmpC e o grupo filogenético em isolados selecionados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras

Foram selecionados 364 *E. coli* isoladas de órgãos de perus provenientes de quatro estados produtores brasileiros: Santa Catarina (99), Paraná (100), Minas Gerais (91) e Goiás (74). As amostras de órgãos foram coletadas de aves que apresentavam sinais clínicos compatíveis com colibacilose. A identificação de *E. coli* foi feita pelas características das colônias em ágar e testes bioquímicos. No ágar sangue foram selecionadas colônias cinza médias brilhantes com ou sem hemólise e no ágar MacConkey colônias positivas para fermentação da lactose. A diferenciação de outras Enterobactérias foi feita através de provas bioquímicas (Lee; Nolan, 2008). Os isolados foram armazenados em criotubos a -20°C em BHI e 50% de glicerol até a realização das análises.

### Antibiograma

Os testes de difusão em ágar e a interpretação dos resultados foram realizados de acordo com o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2012). Os antimicrobianos testados e as concentrações dos discos (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) foram: norfloxacin (10 µg), enrofloxacin (5 µg), amoxicilina (10 µg), ceftiofur (30 µg), tetraciclina (30 µg), oxitetraciclina (30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.7 µg), lincomicina-espectinomicina (109 µg), fosfomicina (200 µg), eritromicina (15 µg), colistina (10 µg), apramicina (15 µg), estreptomicina (300 µg), neomicina (200 µg) e gentamicina (10 µg). Como controle da qualidade das análises foi utilizado *E. coli* ATCC 25922. Os antimicrobianos testados foram selecionados por serem utilizados atualmente ou já terem sido utilizados na avicultura. Os isolados foram caracterizados como resistentes a múltiplas drogas MDR quando apresentaram resistência a  $\geq 1$  antimicrobiano de  $\geq 3$  classes de agente antimicrobianos.

### **Identificação de APEC**

A extração de DNA foi realizada com uma colônia coletada do ágar sangue que foi suspendida em 200 µL de PrepMan <sup>TM</sup>Ultra (Applied Biosystems Inc., Norwalk, Estados Unidos). A suspensão foi agitada por 10-30 segundos para dissolver a colônia e aquecida a 100°C por 10 minutos. Após as amostras foram centrifugadas a 16.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo e utilizado para a amplificação ou armazenado a -20°C até o uso.

Os genes de virulência *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, *ompT* foram pesquisados por PCR multiplex em Tempo Real conforme proposto por Ikuta e colaboradores (2014). Os primers e probes são descritos na Tabela 1. O volume total da reação foi de 30 µL, com 2 µL de DNA extraído, 1,5 U de Taq DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl, 0.06 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 0,25 µM de cada primer e 0,125 µM de cada probe. Os parâmetros de ciclagem foram: 1 ciclo inicial a 95°C por 3 minutos; 40 ciclos de amplificação de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. O *cycle threshold* (CT) para cada amostra foi estabelecido conforme a curva do controle positivo.

### **PCR microarray para identificação de carbapenemases, beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) e genes de cefalosporinases mediadas por plasmídeo (AmpC).**

Isolados selecionados foram testados com o kit Check-MDR CT 101 (Check-Points, Wageningen, Holanda). A extração foi realizada com o kit Qiaamp DNA (Qiagen, Valencia,

Estados Unidos), de acordo com as orientações do fabricante a partir de uma colônia do ágar sangue.

As análises foram feitas conforme as orientações do fabricante em três etapas denominadas reconhecimento, amplificação e detecção. O princípio da técnica é a reação de detecção múltipla em que várias sequências de DNA específicas para os genes pesquisados são geradas e amplificadas por dois *primers* universais. Após a amplificação dos segmentos de DNA as moléculas são hibridizadas com *probes* específicos que contém os chamados *ZIP codes* que são adereçados para uma região específica do *microarray*. A hibridização positiva é identificada através de uma sonda de biotina incorporada em um dos primers. Os tubos são inseridos em um leitor de microarray e as imagens geradas são interpretadas pelo *software* fornecido pelo fabricante. Todas as imagens e resultados gerados foram conferidos pelo fabricante.

### **Classificação Filogenética.**

Para verificar a classificação filogenética de 47 isolados foram utilizados *primers* descritos por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000). Através da combinação da presença e ausência de três genes *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA *TSPE4.C2* (Tabela 1). Essa metodologia classifica isolados de *E. coli* em quatro grupos: A, B1, B2 e D. Como controle positivo foi utilizado a cepa de *E. coli* positiva para os três genes pesquisados gentilmente fornecida pela Profa. Dra. Terezinha Knöbl da Universidade de São Paulo (USP).

O processo de extração de DNA foi realizado utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Estados Unidos) seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, a qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose a 0,8% quantificado por leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm.

O volume final para a reação de amplificação (25µL) foi composto por 200ng da solução de DNA bacteriano e pelos reagentes (Invitrogen, CA, Estados Unidos): 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (DNTP); 1X tampão de PCR (20 mM Tris-HCl – pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, glicerol 50% v/v) 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 20 picomoles dos *primers* *chuA* e *yjaA*, 25 picomoles do *primer TspE4C2* e 1,25U de Taq DNA polimerase. A ciclagem foi realizada obedecendo aos seguintes ciclos: 1 ciclo inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de amplificação, constituídos de 3 etapas: desnaturação a 93°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; completando com mais 1 ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos. Ao término da reação, os produtos amplificados foram

submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com solução de *syber safe* (Invitrogen, São Paulo, Brasil), submetidos a uma voltagem de aproximadamente 8V/cm e, posteriormente, visualizado por luz UV em um transiluminador (L.PIX Loccus biotecnologia). Os tamanhos dos produtos amplificados foram descritos por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).

Tabela 1. Genes pesquisados e primers e probes utilizados na reação de PCR em tempo real e identificação filogenética.

Genes	Primers/Probe	Sequência 5' → 3'	Tamanho (pb)	Referência
<i>iss</i>	F	CGGGAATTGGACAAGAGAAAAC	57	IKUTA et al., 2014
	R	TTTCTGCACCGCCACAAA		
	P	FAM-TTTGGCTGCATCAAC-ZEN-IOWA BLACK FQ		
<i>iutA</i>	F	CGGTGGCGTACGCTATCAGT	59	IKUTA et al., 2014
	R	GCGCGTAGCCGATGAAAT		
	P	VIC-CACTGAAAACAAGATTGAT-MGB		
<i>hlyF</i>	F	GGTTGCCCCGACCATCAATT	61	IKUTA et al., 2014
	R	ACTGGTTGAAGGTAAGCACCCCTAA		
	P	FAM-TTGTTGGCCACAGTCG-MGB		
<i>ompT</i>	F	GGTTCCGGGATTGCTCGTAT	57	IKUTA et al., 2014
	R	GGTCGTGGAGGCAATATGGT		
	P	VIC-CAGCCAGTCCCTGTC-MGB		
<i>iroN</i>	F	CCGTTGGTGCAGAGTGGAA	53	IKUTA et al., 2014
	R	CAGGCTGGTAGAGGAAGGATCA		
	P	FAM-CGCGATAAGCTCG-MGB		
<i>ChuA</i>	F	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	CLERMONT, BONACORSI E BINGEN (2000)
	R	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		



<i>YjaA</i>	F	TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG	211	CLERMONT, BONACORSI E BINGEN (2000)
	R	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
<i>TspEA.C2</i>	F	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	CLERMONT, BONACORSI E BINGEN (2000)
	R	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

---

Legenda: F: *Forward*; R: *reverse*; P: *probe*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Identificação de genes de virulência.

Dos 364 isolados de *E. coli* testados, 307 (84,3%) apresentaram quatro ou cinco dos genes pesquisados e foram caracterizados como APEC. Desses, 65,65% apresentaram os cinco genes pesquisados. Cinquenta e sete isolados apresentaram três ou menos genes e foram caracterizados como comensais (Johnson et al., 2008). A porcentagem dos genes nos isolados classificados como APEC e comensais foram respectivamente: salmoquelina (*iroN*) 92,5/7, fator de sobrevivência aos efeitos líticos do soro (*iss*) 92,5/22,8, aerobactina (*iutA*) 92,5 /35, protease epsomal da membrana externa (*ompT*) 100/47,36 e hemolisina aviária (*hlyF*) 100/53,6. Todos os genes pesquisados foram mais prevalentes na população de APEC do que na de comensais ( $p < 0,05$ ). Os resultados para a combinação de genes e caracterização dos isolados é dada na Tabela 2.

Em Santa Catarina foram amostradas 24 propriedades, no Paraná 28, em Minas Gerais 27 e em Goiás 17. Na maioria dos casos a descrição do quadro clínico era de aves prostradas, espirros, tosse e aumento de mortalidade, as lesões identificadas foram aerossaculite, pericardite, peri-hepatite e ascite. Da fase de peru iniciador (1-30 dias) foram recebidas 156 amostras, do peru terminador 184 amostras e 24 de reprodutoras. De oito (8) amostras de ovos não eclodidos de incubatório localizado no Paraná houve isolamento de APEC do fígado de cinco amostras e comensais de três. Do fígado de 15 peruzinhos de um dia com suspeita de contaminação vertical por *E.coli* oriundos dos quatro estados, 12 amostras foram caracterizadas como APEC.

A proporção de APEC/Comensal nos principais órgãos analisados foi: pulmão (73/12); traqueia (9/7); sinus infraorbitário (3/0); sacos aéreos (4/0); coração (58/6); fígado (86/18); baço (38/6); rins (11/0); intestino (22/4).

Tabela 2. Presença e combinação de genes pesquisados nos isolados caracterizados como APEC e comensais.

%Amostras (Quantidade)	Genes					Caracterização
	<i>iutA</i>	<i>hlyF</i>	<i>iss</i>	<i>iroN</i>	<i>ompT</i>	
65,65% (239/364)	+	+	+	+	+	APEC
6,04 (22/364)	-	+	+	+	+	APEC
6,6% (24/364)	+	+	-	+	+	APEC
6,04% (22/364)	+	+	+	-	+	APEC
3,84%(14/364)	-	-	-	-	-	Comensal
3,57% (13/364)	-	+	-	-	+	Comensal
2,47% (9/364)	+	+	-	-	+	Comensal
1,37% (5/364)	+	-	+	+	-	Comensal
1,37% (5/364)	+	-	-	-	-	Comensal
1,37% (5/364)	-	+	-	+	+	Comensal
0,82% (3/364)	-	-	-	+	-	Comensal
0,54% (2/364)	+	+	-	-	-	Comensal
0,27% (1/364)	-	+	-	-	-	Comensal

Diversos estudos associaram a presença do plasmídeo CoIV e os genes relacionados a ele a isolados de APEC (Ewers et al., 2004; Cunha et al., 2014; Oliveira et al., 2015). Johnson e colaboradores (2008) propuseram um *pentaplex* composto pelos genes associados à virulência *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, *ompT* localizados em ilhas de patogenicidade principalmente no plasmídeo CoIV. Esses genes foram selecionados por serem capazes de classificar com

sucesso isolados de *E. coli* como APEC ou AFEC. Nesse estudo foi observada alta taxa de isolados contendo 4 e 5 genes, curiosamente todos os isolados que foram positivos para *ompT* também foram positivos para *hlyF*, fato que também foi demonstrado por Oliveira e colaboradores (2015). A proximidade desses dois genes no plasmídeo CoIV como demonstrado no sequenciamento por Johnson et al. (2006), pode ser o motivo para esse fato.

Através de estudos com inoculação experimental em aves, a presença de cada um dos genes de virulência do *pentaplex* foi associada com o aumento da patogenicidade (Johnson et al., 2008, Oliveira et al., 2015). No entanto, Oliveira et al. (2015) encontraram isolados provenientes de fezes e cama de aviário sem patogenicidade em pintinhos, mas que foram positivos para dois, três ou quatro genes. Nesse estudo também foi encontrada alta frequência de isolados APEC em amostras de intestino, sendo que das 26 amostras analisadas 22 (84,61%) foram classificadas como APEC. Esses resultados podem indicar que a microbiota intestinal pode servir como reservatório de genes de virulência que podem ser transferidos horizontalmente, já que são localizados principalmente em plasmídeo (Kemmett et al., 2013; Solá-Ginés et al., 2015).

A presença de isolados de APEC em amostras de fígado de embriões não eclodidos e peruzinhos de um dia pode ser um indicativo de transmissão vertical de *E. coli*. A contaminação do peruzinho pode advir de duas causas: a reprodutora com infecção no útero ou no ovo depositado em ambiente contaminado. Nos dois casos, nos primeiros dias de vida os demais peruzinhos podem ser infectados com a estirpe patogênica principalmente pela via respiratória (Montgomery et al., 1999).

Isolados com menos de quatro genes e por consequência considerados comensais foram isolados de órgãos de perus com sinais clínicos de colibacilose e relato de aumento de mortalidade. Nesses casos problemas de imunidade e outros fatores predisponentes podem ter proporcionado a colonização de órgãos com isolados com menor patogenicidade (Barnes; Vaillancourt; Gross, 2003). Há a possibilidade de outros agentes infecciosos não pesquisados estarem associados aos quadros clínicos, apesar de resultados negativos para as principais bactérias responsáveis por septicemia em perus como *Pasteurella multocida*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *Salmonella* spp. (dados não mostrados).

### **Antibiograma.**

Na análise de antibiograma, 299/364 (82,14%) dos isolados foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos e foram classificadas como isolados MDR. No entanto, se a eritromicina for excluída o número de MDR passa a 171 (47%). Somente um isolado foi sensível para todos os antimicrobianos testados. O número de isolados resistente/número de classes de antimicrobianos foi: 16/1, 48/2, 67/3, 73/4, 50/5, 59/6, 40/7, 7/8, 3/9. A análise de associação realizada pelo Teste de Fisher e o cálculo de razão de Odds (0,05 e RO = 0,96) demonstrou que não há diferença na distribuição de isolados MDR entre os isolados caracterizados como APEC e comensais.

Os maiores índices de resistência foram para eritromicina (99%), amoxicilina (76,1%), oxitetraciclina (58,5%), tetraciclina (57,7%), lincomicina associada a espectinomicina (52,7%) e sulfametoxazole associada a trimetoprim (48,6%) (Figura 1).

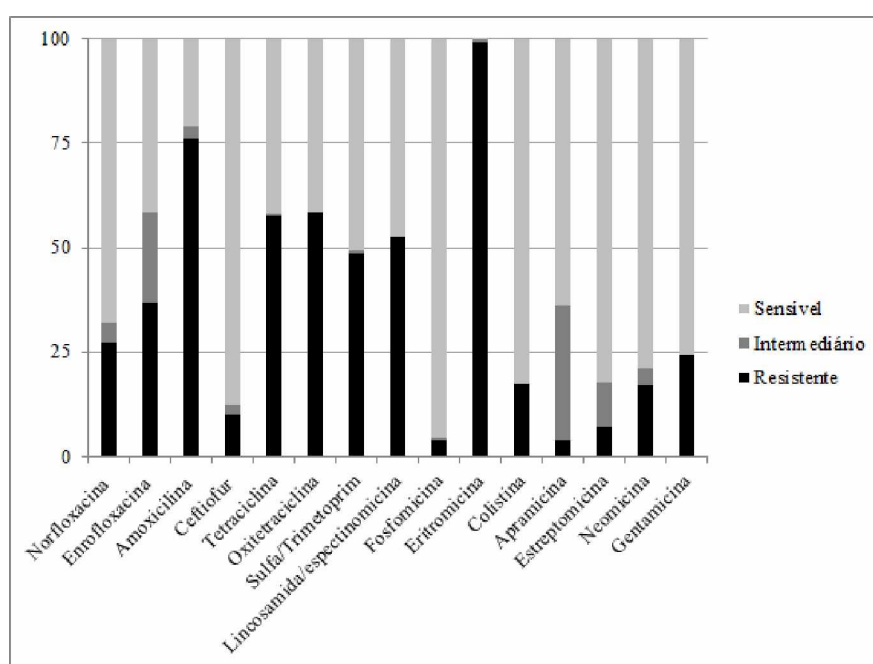
A emergência e disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos na medicina veterinária são consideradas o resultado do uso indiscriminado dessas drogas. Sistemas intensivos de produção de aves e suínos em diversos países fazem uso de doses subterapêuticas na alimentação animal para o controle de doenças. Essa forma de produção vem sendo questionada pois é associada a emergência de isolados multirresistentes na saúde pública (Mellata et al., 2013). Essa constatação culminou com a proibição de promotores de crescimento em diversos países da Europa, tendência que tem se expandido para os demais países, principalmente os exportadores para o continente europeu.

Assim como no presente estudo, outros autores relatam altos índices de isolados de *E. coli* MDR. No Brasil foram observadas frequências de MDR de 92% e 54,6% respectivamente, em isolados de APEC de aerossaculite e celulite (Barbieri et al., 2013; Cunha et al., 2014). Resultados semelhantes também foram reportados nos Estados Unidos, China e Itália (Ghodousi et al., 2015; Yang et al., 2004; Zhao et al., 2005).

A eritromicina, tetraciclina e oxitetraciclina, antibióticos atualmente proibidos no país como promotores de crescimento, mas extensivamente usados no passado apresentaram altos índices de resistência, valores similares foram encontrados por outros autores no Brasil e nos Estados Unidos. O mesmo ocorre com os altos índices de resistência a sulfonamidas (Zhao et al., 2005; Barbieri et al., 2013; Cunha et al., 2014).

A resistência a colistina encontrada nesse estudo (17,3%) diverge de outros autores em que não houve resistência (Giovanardi et al., 2013; Solá-Ginés et al., 2015). A resistência a colistina é relevante pela importância dessa droga na medicina humana como um dos últimos recursos no tratamento de infecções hospitalares e pela recente descoberta do gene MCR-1 localizado em plasmídeo em isolados de *E. coli* de suínos e aves o que preocupa pela possibilidade de disseminação da resistência com rapidez (Liu et al., 2015; Hasman et al., 2015).

Figura 1. Porcentagem de resistência e sensibilidade aos antimicrobianos testados.



As fluoroquinolonas são drogas muito utilizadas para o tratamento de colibacilose, principalmente na forma respiratória em perus (Cagnardi et al., 2014). A resistência a norfloxacina (27,19%) e a enrofloxacina (36,81%) encontradas nesse estudo foram superiores as encontradas por outros autores no Brasil e nos Estados Unidos (Zhao et al., 2005; Barbieri et al., 2013; Cunha et al., 2014). Na classe dos aminoglicosídeos a maior taxa de resistência foi observada para gentamicina (24,4%), valor superior ao encontrado no Brasil por Barbieri et al. (2013), mas próximo do encontrado em isolados de aerossaculite de perus (Cunha et al., 2014).

Nesse estudo a prevalência da resistência aos beta-lactâmicos amoxicilina (76%) e cefotiofur (9,9%) também foi superior aos que foram encontrados em estudos no Brasil e na Itália (Barbieri et al., 2013; Cunha et al., 2014; Solá-Ginés et al., 2015). O Estado de Goiás

teve a maior contribuição de isolados com resistência a ceftiofur com 72,22% do total. Em Santa Catarina, Paraná e Minas Gerais foram encontrados respectivamente, 13,8%, 5,5% e 8,33% de isolados com esse fenótipo. A maior prevalência de isolados resistentes a ceftiofur no estado de Goiás pode ser um indicativo do maior uso da droga e da circulação de genes que codificam ESBL e AmpC na região.

**Genes carbapenemases, beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) e genes de cefalosporinas mediadas por plasmídeo (AmpC).**

Dos 36 isolados resistentes para amoxicilina e ceftiofur (RA/RC), 33 foram identificados como APEC e 3 como comensais. No sul do Brasil 100% dos isolados com esse fenótipo (7/7) foram classificados como ESBL do grupo CTX-M-2. No centro-oeste e sudeste do Brasil dos 29 com esse fenótipo, 62,0% (18/29) foram caracterizados como grupo CTX-M-2, 13,8%(4/29) como grupo CTX-M-8/25, e 24,14% (7/29) como pAmpC do grupo CMY-2.

Dos oito isolados resistentes para amoxicilina e intermediários para ceftiofur (RA/IC), seis foram caracterizados como APEC e dois como comensais. No sul do país 100% (3/3) foram caracterizados como CTX-M-8/25. No sudeste e centro-oeste, 40% (2/5) foram caracterizados como grupo CTX-M-2, 40% (2/5) como CMY-2 e 20% (1/5) como TEM *wild*.

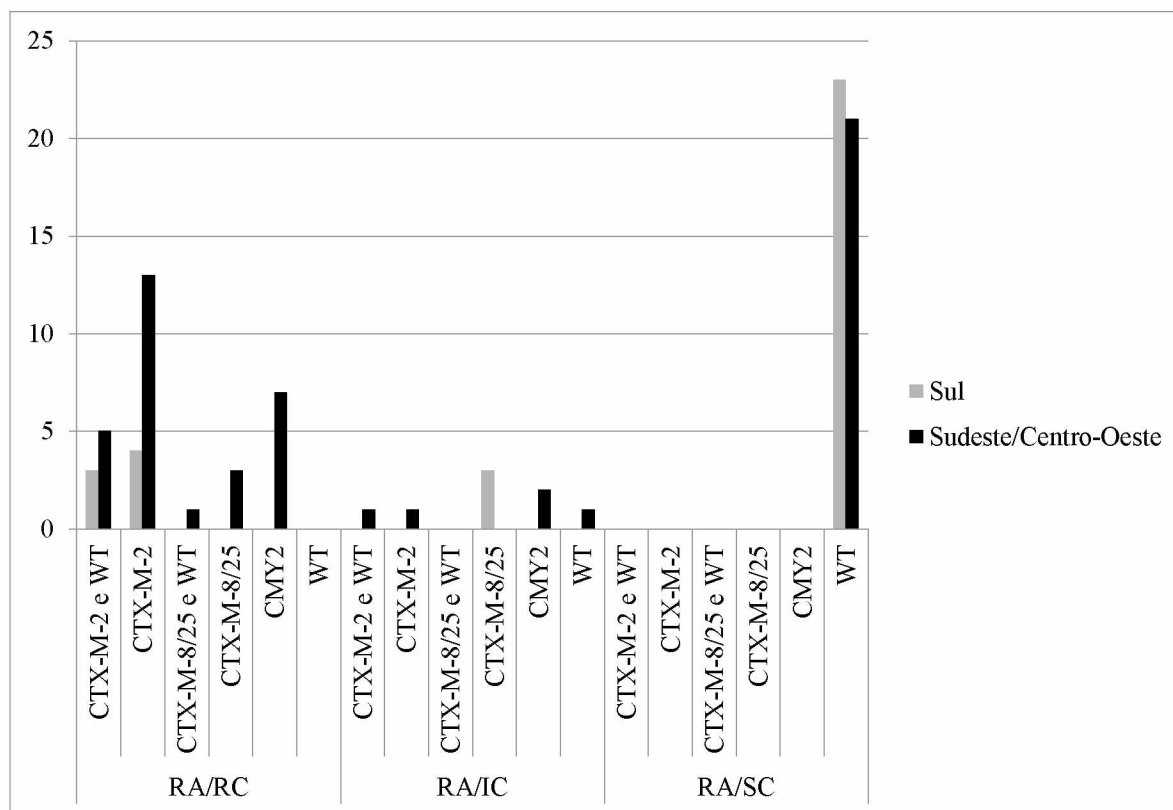
Entre os 46 isolados resistentes para amoxicilina e sensíveis para ceftiofur (RA/SC), 27 foram caracterizados como APEC e 19 como comensais. No sul 100% (23/23) dos isolados foram caracterizados com TEM *wild* e no centro-oeste e sudeste 91,30% (21/23) como TEM *wild* e 8,7% (2/23) foram negativos.

Trinta e quatro isolados foram caracterizados como ESBL, entre eles 79,4% (27/34) foram positivos para genes que codificam enzimas beta-lactamases do grupo CTX-M-2 e 20,59% (7/34) para o grupo CTX-M-8/25. Nove isolados foram caracterizados como pAmpC, todos são do grupo CMY-2.

Os grupos TEM, SHV e CTX-M (ESBL) são as mais relevantes clinicamente e são capazes de degradar cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração, penicilinas e monobactâmicos, mas são inibidas por inibidores de beta-lactamases como o ácido clavulânico. As pAmpC como o grupo CMY-2, são capazes de hidrolisar e neutralizar quase todos os beta-lactâmicos, mas, ao contrário das ESBL, não são inibidas pelo ácido clavulânico. Os isolados caracterizados como do grupo TEM *wild* identificados nesse estudo possuem genes

que codificam enzimas do grupo TEM que não são ESBL, mas são capazes de inibir a amoxicilina e a ampicilina (Reich et al., 2013).

Figura 2. Distribuição dos grupos de beta-lactamases e pAmpC nos fenótipos de resistência e estados produtores pesquisados.



Legenda: RA/RC: Resistente Amoxicilina/Resistente Ceftiofur; RA/IC: Resistente Amoxicilina/ Intermediário Ceftiofur; RA/SC: Resistente Amoxicilina/Sensível Ceftiofur; SI: Sinus Infraorbitário; SC: Santa Catarina; PR: Paraná; GO: Goiás; MG: Minas Gerais; WT: *wild* TEM.

A resistência a antimicrobianos é um assunto de preocupação crescente, devido à séria limitação de drogas efetivas contra infecções bacterianas e a emergência de casos de infecções nasocomiais sem drogas eficazes. Cefalosporinas de terceira geração são antibióticos usados com frequência no tratamento de infecções em humanos causadas por bactérias Gram-negativas, especialmente *E. coli* (Ghodousi et al., 2015). *E. coli* produtoras de ESBL e AmpC estão associadas com doenças localizadas e sistêmicas em humanos (Reich et al., 2013). Os genes responsáveis por codificarem ESBL estão presentes principalmente em plasmídeos e por isso sua disseminação horizontal entre estirpes ocorre com facilidade. Além disso, apesar da existência de gene AmpC no cromossomo da *E. coli*, genes associados a plasmídeo são mais frequentemente encontrados (Nikaido, 2009).

A maioria dos isolados para detecção de genes codificadores de beta-lactamases, ESBL e AmpC são feitas em carcaças de aves, possivelmente devido à crescente preocupação com a transferência de genes de resistência e virulência para a microbiota humana ou mesmo a associação de isolados APEC com ExPEC patogênicas para humanos (Rodriguez-Siek et al., 2005; Vincent et al., 2010; Jakobsen et al., 2012; Manges; Johnson, 2012). O presente estudo é um dos primeiros a verificar genes codificadores de beta-lactamases, ESBL e AmpC em casos sugestivos de colibacilose de perus.

Em análises realizadas no Reino Unido de carcaças de aves importadas do Brasil e do Chile, foram identificadas *E. coli* positivas para ESBL grupo CTX-M-2 e CTX-M-8 (DHANJI et al., 2010). Estudos realizados com carcaças de frango e aves saudáveis do Brasil, demonstraram a presença de isolados positivos para CTX-M-2, CTX-M-8 e CMY-2 (Egervärn et al., 2014; Ferreira et al., 2014; Botelho et al., 2015). Pesquisas realizadas em amostras da Europa, por outro lado, tem relatado a presença principalmente de genes codificadores de ESBL dos grupos SHV, TEM e CTX-M-1. AmpC são menos encontradas, mas a família CMY-2 é a mais relatada (Costa et al., 2009; Cohen et al., 2012; Ghodousi et al., 2015). Os grupos CTX-M-1 e CMY-2 também foram relatados nos Estados Unidos (Doi et al., 2010).

A presença de ESBL e pAmpC em isolados de APEC e comensais nesse estudo indica a grande importância do controle de antibióticos na produção de aves e corrobora com os achados de estudos feitos em carcaças. A maior distribuição de genes ESBL e pAmpC em isolados APEC pode ser um indício da localização desses genes também no plasmídeo CoIV ou outros plasmídeos que carregam os mesmos genes. Isolados comensais carregando genes de resistência são reportados na literatura (Johnson et al., 2008; Oliveira et al., 2015). É preocupante o fato que nos isolados caracterizados como ESBL somente dois não foram caracterizados como MDR, no caso dos pAmpC todos são também MDR indicando que esses isolados acumulam resistência a diversas classes de antimicrobianos.

Chama a atenção a maior taxa de resistência ao ceftiofur no estado de Goiás e a presença de pAmpC do grupo CMY-2, indicando que nessa região há circulação de estirpes bacterianas que possivelmente foram selecionadas pelo uso de ceftiofur e que pode estar ocorrendo a disseminação desse gene, dada a sua localização plasmidial.

### **Identificação Filogenética.**



Dos 47 isolados testados, quarenta isolados foram caracterizados como APEC e sete como comensais. Dos isolados caracterizados como APEC 29,7% (14/47) foram identificados como do grupo B1, 2,12% (1/47) do grupo B2 e 40,42% (19/47) do grupo D. Nos isolados comensais 2,12% (1/47) foi identificado como B1 e 2,12% (1/47) como D. Onze isolados (23,40%) não foram classificados (dados não mostrados).

Nesse estudo os principais grupos identificados foram o B1 e D. Em estudo realizado com isolados de saco aéreos de perus com aerossaculite Cunha e colaboradores (2014), encontraram em ordem decrescente de prevalência isolados classificados nos grupos filogenéticos B2, B1, A e D. Em estudos realizados em carcaças de aves também é relatada a prevalência de amostras classificadas nos grupos filogenéticos B1 e A (Hannah et al., 2009; Lyhs et al., 2012; Ghodousi et al., 2015). Segundo Walk e colaboradores (2007), a maioria dos isolados de *E. coli* capazes de sobreviver no meio ambiente são do grupo B1.

Em estudo com inoculação experimental em pintinhos realizado por Oliveira et al. (2015), isolados com maior escore de patogenicidade pertenciam principalmente aos grupos B2 e D, enquanto os com menor patogenicidade ao grupo A e B1. ExPEC humanas pertencem principalmente ao grupo B2 e com menor frequência ao grupo D. Isolados do grupo B2 são mais virulentos em isolados ExPEC e normalmente são equipados com mais genes de virulência (Smith; Fratamico; Gunther 2007; Mellata, 2013).

A presença de um isolado caracterizado como grupo B2 e positivo para pAmpC em fígado de embrião não eclodido chama a atenção pela possibilidade de contaminação vertical de isolados altamente patogênicos nas reprodutoras e a transmissão do gene de resistência entre *E. coli* e outras espécies de bactérias.

## CONCLUSÕES

Os dados obtidos nesse trabalho demonstram a alta prevalência de genes de virulência em isolados de *E. coli* de órgãos de perus suspeitos de colibacilose, alta resistência a antimicrobianos importantes no tratamento de doenças na avicultura como amoxicilina e enrofloxacina e o aparecimento de resistência a antimicrobianos de grande importância na saúde humana como colistina e ceftiofur. A presença de genes ESBL e AmpC nos isolados reforça a questão da importância do controle do uso de antimicrobianos e o risco da difusão da resistência para comunidades humanas.

## REFERÊNCIAS

Barbieri NL, Oliveira AL, Tejkowski TM, Pavanelo DB, Rocha DA, Matter LB, Callegari-jacques SM, Brito G, Horn F (2013) Genotypes and Pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. PLoS One 8:1-9.

Barnes HJ, Vaillancourt JP, Gross WB (2003) Colibacillosis. SAIF, Y.M.(Ed.). Diseases of Poultry, ed.11. Iowa State University Press, Ames, IA, p. 631-652.

Botelho LAB, Kraychete GB, Costa e Silva JL, Regis DVV, Picão RC, Moreira BM, Bonelli RR (2015) Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. Mem Inst Oswaldo Cruz 110: 249–254.

Cagnardi P, Ferraresi C, Lucatello L, Meucci V, Intorre L, Grilli G, Piccirillo A, Giacomelli M, Montesissa C (2014) Enrofloxacin against *Escherichia coli* in turkeys: which treatment scheme is effective? Poult Sci 93:1667-1674.

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. Appl Environ Microbiol 66:4555-4558.

CLSI. Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacterial isolated from animals; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M31-A3. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

Cohen Stuart J, Van Den Munckhof T, Voets G, Scharringa J, Fluit A, Hall ML (2012) Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. Int J Food Microbiol 154:212-214.

Costa D, Vinué L, Poeta P, Coelho AC, Matos M, Sáenz Y, Somalo S, Zarazaga M, Rodrigues J, Torres C (2009) Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* isolates in fecal samples of broilers. Vet Microbiol 118:339-344.

Cunha MPV, Xavier de Oliveira MG, Vilela de Oliveira MC, Silva CK, Gomes CR, Moreno AM, Knobl T (2014) Virulence profiles, phylogenetic background, and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from turkeys with aerosacculitis. ScientificWorldJournal 2014:1-8.

Dhanji H, Murphy NM, Doumith M, Durmus S, Lee SS, Hope R, Woodford N, Livermore DM (2010) Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. *J Antimicrob Chemother* 65:2534-2537.

Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, López-Cerero L, Navarro MD, Adams-Haduch JM, Qureshi ZA, Sidjabat HE, Rodríguez-Baño J (2010) Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect* 16:33-38.

Dziva F, Stevens MP (2008) Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol* 37:355-366.

Egervärn M, Börjesson S, Byfors S, Finn M, Kaibe C, Englund S, Lindblad M (2014) *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. *Int J Food Microbiol* 171:8-14.

Ewers C, Janßen T, Kießling S, Philipp HC, Wieler LH (2004) Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol* 104:91-101.

Ewers C, Janßen T, Kießling S, Philipp HC, Wieler LH (2005) Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Avian Dis* 49:269-273.

Ewers C, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, Antao EM, Laturnus C, Diel L, Glodde S, Homeier T, Bohnke U, Sternruck H, Philipp HC, Wieler LH (2007) Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli* how closely related are they?. *Int J Med Microbiol* 297:163-176.

Fallavena LCB, Moraes HLS, Salle CTP, Da Silva AB, Vargas RS, Do Nascimento VP, Canal CW (2000) Diagnosis of Skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses –A microscopic and macroscopic study. *Avian Pathol* 29:557-562.

Ferreira JC, Penha Filho RA, Andrade LN, Berchieri AJ, Darini AL (2014) Detection of chromosomal bla(CTX-M-2) in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. Clin Microbiol Infect 20:623–626.

Ghodousi A, Bonura C, Di Noto AM, Mammina C (2015) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC- producing, and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in retail broiler chicken meat, Italy. Foodborne Pathog Dis 12:619-625.

Giovanardi D, Lupini C, Pesente P, Rossi G, Ortali G, Catelli E (2013) Characterization and antimicrobial resistance analysis of avian Pathogenic *Escherichia coli* isolated from Italian Turkey flocks. Poult Sci 92:2661-2667.

Hannah LE, Johnson JR, Angulo F, Haddadin B, Williamson J, Samore MH (2009) Molecular analysis of antimicrobial-susceptible and resistant *Escherichia coli* from retail meats and human stool and clinical specimens in a rural community setting. Foodborn Pathogen Dis 6:285-295.

Hasman H, Hammerum A, Hansen F, Hendriksen R, Olesen B, Agersø Y, Zankari E, Leekitcharoenphon P, Stegger M, Kaas R, Cavaco L, Hansen D, Aarestrup F, Skov R (2015) Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015.

Kemmett K, Humphrey T, Rushton S, Close A, Wigley P, Willians NJ (2013) A longitudinal study simultaneously exploring the carriage of APEC virulence associated genes and the molecular epidemiology of faecal and systemic *E. coli* in commercial broiler chickens. PLoS One 8: 6e67749.

Ikuta N, De Oliveira Solla Sobral F, Lehmann FK, Da Silveira PV, De Carli S, Casanova YS, Celmer AJ, Fonseca AS, Lunge VR (2014) Taqman real-time PCR assays for rapid detection of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. Avian Dis 58:628-631.

Jakobsen L<sup>1</sup>, Garneau P, Bruant G, Harel J, Olsen SS, Porsbo LJ, Hammerum AM, Frimodt-Møller N (2012) Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31:1121-1129.

Johnson TJ, Skyberg J, Nolan LK (2004) Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. *Avian Dis*48:351-360.

Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK (2006) DNA sequence of a CoIV plasmid and prevalence of selected plasmid encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol*188:745-758.

Johnson JR, Sannes MR, Croy C, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Bender J, Smith KE, Winokur PL, Belongia EA (2007) Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. *Emerg Infect Dis*13:838-846.

Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK (2008) Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J Clin Microbiol*46:3987-3996.

Lee MD, Nolan LK Colibacillosis. In: Zavalla, LD, Swayne DE, Glisson JR, Pearson JE, Reed WM, Jackwood MW, Woolcock (2008). A laboratory manual for the isolation, Identification and Characterization of avian pathogens. American Association of avian Pathologists, Washington, D.C.

Li G, Laturnus C, Ewers C, Wieler LH (2005) Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun*73:2818-2827.

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu, LF, Gu D, Ren H, Chen X, Ly L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*16:161:168.

Lyhs U, Ikonen I, Pohjanvirta T, Raninen K, Perko-Mäkelä P, Pelkonen S (2012) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in poultry meat products on the Finnish retail market. *Acta Vet Scand*54:64.

Mandell GL, Douglas, RG, Bennett JE, Dolin R (2005) Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Edn New York: Churchill Livingstone,

Manges AR, Johnson JR (2012) Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. Clin Infect Dis 55: 712-719.

Mellata M (2013) Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trend. Foodborne Pathog Dis10:916-932.

Moulin-Schouleur M, Schouler C, Tailliez P, Kao MR, Brée A, Germon P, Oswald E, Mainil J, Blanco M, Blanco J (2006) Common virulence factors and genetic relationship between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolated of human and avian origin. J Clin Microbiol44:3484-3492.

Nikaido H (2009) Multidrug resistance in bacteria. Annu Rev Biochem78:119-146.

Oliveira AL, Rocha DA, Finkler F, de Moraes LB, Barbieri NL, Pavanelo DB, Winkler C, Grassotti TT, de Brito KC, de Brito BG, Horn F (2015) Prevalence of CoIV Plasmid-Linked Genes and IN Vivo pathogenicity of Avian Strains of *Escherichia coli*. Foodborne Pathog Dis12:679-685.

Pass MA, Odedra R, Batt RM (2000) Multiplex PCRs for Identification of *Escherichia coli* virulence genes. J Clin Microbiol38:2001-2004.

Reich F, Atanassova V, Klein G (2013) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase – and AmpC-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. Emerg Infec Dis19:1253-1259.

Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK (2005) Characterizing the APEC pathotype. Vet Res36:241-256.

Russo TA, Johnson JR (2000) Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. J Infect Dis181:1753-1754.

Schouler C, Schaeffer B, Brée A, Mora A, Dahbi G, Biet F, Oswald E, Mainil J, Blanco J, Moulin-Schouleur M (2012) Diagnostic Strategy for Identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. J Clin Microbiol50:1673-1678.

Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW (2007) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Foodborne Pathog Dis4:134-163.

Solà-ginés M, Cameron-Veas K, Badiola I, Dolz R, Majó N, Dahbi G, Viso S, Mora A, Blanco J, Piedra-Carrasco N, González-López JJ, Migura-García L (2015) Diversity of Multi-Drug Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causing outbreaks of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain. PLoS One10:1-14.

Stordeur P, Marlier D, Blanco J, Oswald E, Biet F, Dho-Moulin M, Mainil J (2002) Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesion genes importante in disease caused by mammalian pathogenic *E.coli*. Vet Microbiol84:231-241.

UBABEF (União Brasileira de Proteína Animal). Relatório Anual 2015. Capturado em 09 de fevereiro de 2016. Online Disponível na internet: [http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual\\_UBABEF\\_2015\\_DIGITAL.pdf](http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf)

Vincent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C, Reid-Smith RJ, Tellier PP, Tellis PA, Ziebell K, Manges AR (2010) Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. Emerg Infect Dis16:88-95.

Walk ST, Alm EW, Calhoun LM, Mladinicky JM, Whittam TS (2007) Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. Environ Microbiol9:2274-2288.

Yang H, Chen DG, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R, Meng J (2004) Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. J Clin Microbiol42:3483-3489

Zhao S, Maurer JJ, Hubert S, De Villena JF, McDermott PF, Meng J, Ayers S, English L, White DG (2005) Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. Vet Microbiol107:215-224.

**APÊNDICE A - INSTRUÇÕES AOS AUTORES – BRAZILIAN JOURNAL OF  
MICROBIOLOGY**



### **Escopo da Revista**

A partir do dia 01/01/2015 o Brazilian Journal of Microbiology (BJM) aceitará manuscritos que versem sobre genoma de microrganismo sequenciado recentemente. Eles serão publicados na seção "Genome Announcement". O objetivo desta seção é permitir que autores do sequenciamento informem aos leitores do BJM sobre um genoma que está disponível e qual seria o interesse para a comunidade científica. O publicação não impedirá a futura publicação de um artigo científico completo no BJM ou em outra revista.

Escopo da seção “Genome Announcement” no BJM:

- Os autores da publicação deverão ser os mesmos ou na sua maioria dos contidos no depósito da sequência do genoma;
- A sequência do genoma deve estar disponível para o público no DDBJ / EMBL / NCBI dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), no momento do envio do manuscrito para o BJM. O número de acesso válido no GenBank para o genoma, deve ser claramente indicado no manuscrito;
- As sequências completas de plasmídeos circulares serão aceitas sem lacunas;
- As sequências de nucleotídeos que se refere o “announcement” , deve cobrir pelo menos 95% do tamanho do genoma esperado para o organismo;
- Serão considerados para publicação depósitos completos feitos no GenBank e gapped cromossomos (scaffolded) do genoma. Para tais depósitos é preferível ter uma anotação funcional.

- O manuscrito enviado para a seção “Genome Announcement” deve conter no máximo 500 palavras no corpo do texto e um resumo de 150 palavras;
- Os autores devem indicar claramente a origem da cepa microbiana, a importância de ter sequenciado o genoma e os benefícios que o campo da microbiologia.
- O texto deve conter a metodologia utilizada no sequenciamento, incluindo o número e tamanho das leituras geradas, métodos de montagem utilizado, as medidas tomadas para gerar os scaffolds e para fechar o genoma, quando aplicável. Além disso, informar quais métodos serão utilizados para anotação e curadoria se for o caso.

A revista *Brazilian Journal of Microbiology*, editada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, publica artigos originais, e trabalhos de revisão que cobrem todos os aspectos da Microbiologia. Não são cobradas taxas para publicação de artigos.

As seguintes categorias de artigos são aceitas para publicação no *Brazilian Journal of Microbiology*:

- **Artigos Originais:** reportam resultados científicos originais que ainda não tenham sido publicados em outro periódico;
- **Artigos de Revisão:** abordam temas ligados à microbiologia em geral e de amplo interesse da área.

Seu manuscrito deve ser escrito em inglês **claro e compreensível**.

Se você tiver dúvidas sobre o nível de inglês do seu texto, você pode optar por ter o seu manuscrito editado profissionalmente por um nativo da língua inglesa ou por um serviço de editoração científica **antes da submissão** do seu manuscrito. Todos os serviços devem ser organizados e pagos pelo autor, e o uso de um desses serviços não garante a aceitação ou preferência para publicação do manuscrito. No caso de o autor ser um nativo da língua inglesa, por favor, substituir o certificado de Inglês por uma carta de justificativa.

É um prazer aceitar o seu trabalho para ser publicado na Revista Brasileira de Microbiologia. No entanto, só será publicada uma vez revisada a versão final do texto em

Inglês. Por favor, envie o texto revisado e o certificado emitido pelo " American Journal Experts ".

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>

### **Submissão de um artigo**

Um artigo para ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* não deve ter sido previamente publicado (exceto na forma de resumo) nem ter sido submetido em qualquer outro periódico.

As instruções para submissão *online* estão disponíveis neste site.

Todos os autores serão informados por mensagem eletrônica a respeito da submissão eletrônica. A mensagem também questionará se todos os autores concordam com a submissão. Ausência de resposta será considerada como concordância à submissão.

A responsabilidade pela exatidão do conteúdo do manuscrito é de inteira responsabilidade dos autores.

### **Publicação do artigo**

Os artigos são aceitos para publicação após terem sido revisados de forma crítica por pelo menos dois revisores, indicados pelos editores.

As sugestões e recomendações dos revisores e editores serão encaminhadas eletronicamente ao autor para correspondência, o qual deverá retornar o artigo revisado aos editores na data

estipulada, pelo sistema *online*. O autor para correspondência deverá explicar ou comentar as alterações introduzidas no texto.

O autor para correspondência receberá uma mensagem eletrônica sempre que houver alteração do *status* do artigo.

Não é necessário ser associado da Sociedade Brasileira de Microbiologia para submeter artigo para publicação.

Todos os cientistas, brasileiros ou estrangeiros, são convidados a submeterem artigos para publicação.

## ÉTICA

O(s) autor(es) devem informar, no texto do artigo, se o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de sua Instituição, em consoante à Declaração de Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>). Nos trabalhos experimentais que envolvem animais, as normas estabelecidas no "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (*Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996*), e os "*Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal*" (COBEA - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>) devem ser respeitados.

## Preparo do artigo

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Título resumido
- Resumo (200 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

*Artigos Originais e Artigos de revisão* deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências, tabelas e figuras.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Comission* (*Comission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections*). As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

## SUGESTÕES DE REVISORES

Os autores poderão enviar sugestões de revisores para avaliação dos artigos. Deverão constar as seguintes informações: nome; e.mail e Instituição de Origem.

## USO DE EXTRATOS DE PLANTAS EM EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

Artigos que apresentarem estudos com extratos de plantas, ou extratos de outras substâncias complexas, serão aceitos apenas após identificação dos compostos.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

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

## ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser redigidas em ordem alfabética e começar pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As citações no texto devem ser escritas pelo último nome do primeiro autor, seguido pelo ano de publicação. Como exemplo, tem-se: "... while Silva and Pereira (1987) observed that resistance depended on soil density" ou "It was observed that resistance depended on soil density (Silva and Pereira, 1987)." Para a citação de dois ou mais artigos do mesmo autor, liste em ordem cronológica sendo que os anos devem ser separados por vírgula (exemplo: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000; Hene 2010;



Padonou et al., 2012). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o *BIOSIS*. Todas as referências incluídas na lista final devem ter sido citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem aparecer na lista final.

Exemplos:

- a. **Artigos de Periódicos**  
 Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz J Microbiol* 37:101-107.
- b. **Artigos ou Capítulos de Livro**  
 Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. *In*: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.
- c. **Livros**  
 Montville TJ, Matthews KR (2005) *Food Microbiology - an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.
- d. **Patentes**  
 Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.
- e. **Teses e Dissertações**  
 Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).
- f. **Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)**  
 Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.
- g. **Publicações na Web**  
 Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>



#### h. **Webpage**

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

As citações do tipo "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheçam que, eventualmente, elas possam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista final de referências. As referências que consistem de artigos que foram "aceitos para publicação" ou "no prelo" são aceitáveis. No entanto, as referências dos artigos que são "submetidos" ou "em preparação" não são aceitas.

**AGRADECIMENTOS:** Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

**TABELAS:** devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas sequencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

**FIGURAS:** devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas sequencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

**FOTOGRAFIAS:** Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

#### **Conflitos de Interesses**

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

## DIREITOS AUTORAIS

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; [bjm@sbmicrobiologia.org.br](mailto:bjm@sbmicrobiologia.org.br)), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

### Transferência de "Direitos Autorais"

"O(s) autor(es) abaixo assinado(s) afirmam que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado anteriormente. O(s) autor(es) confirma(m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s). Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian Journal of Microbiology* e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seus Editores."

Artigo nº. \_\_\_\_\_

Título \_\_\_\_\_ do \_\_\_\_\_ Artigo:  
" \_\_\_\_\_ "

Nome(s) do(s) Autor(es)

Assinatura(s)


Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_