

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

**CARACTERIZAÇÃO PATOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Escherichia coli*
OBTIDOS DE SUÍNOS: PRESENÇA DE PLASMÍDEOS E PERFIL DE
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.**

MATEUS MATIUZZI DA COSTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como um dos requisitos para obtenção do grau de Doutor.

Prof^a. Dr^a. Irene Silveira Schrank
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Agueda Castagna de Vargas
Co-Orientadora

Porto Alegre, maio de 2007.

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), sendo financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a minha família pelo apoio incondicional e razão da minha vida, sem a qual este trabalho não seria possível, nem teria sentido;

Agradeço ao Gabriel e Dona Erani pelo apoio, amizade e carinho em todos os momentos do doutorado;

As professoras Irene Silveira Schrank e Agueda Castagna de Vargas pela orientação, apoio e por confiar em mim. Além do modelo profissional pelo qual devo agradecer sempre;

Aos professores Augusto Schrank, Marilene Henning Vainstein e Henrique Ferreira pela leitura, críticas e sugestões realizadas ao longo do estudo, que foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho e evolução profissional;

Ao Guilherme, Franciele e Shana, os quais foram essenciais para execução do trabalho e demonstraram amizade ao longo destes anos. Muito obrigado pelo apoio sempre que necessitei;

A Cristina e Sonia pelo apoio técnico, ombro e amizade em todos os momentos;

As equipes dos laboratórios de microbiologia da UNOESC, LABAC da UFSM, 222 da UFRGS e microbiologia da UNIVASF, pelo apoio, carinho e amizade sem o qual este trabalho não seria possível;

A Silvia e Luciano, bem como os demais funcionários de PPGBCM e Centro de Biotecnologia da UFRGS pelo auxílio e apoio na execução do doutorado;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| Lista de Abreviações, Símbolos e Unidades..... | vi |
| Lista de Tabelas..... | ix |
| Lista de Figuras..... | x |
| Resumo..... | xi |
| Abstract..... | xiv |
| <u>Capítulo 1</u> – Introdução..... | 02 |
| <u>Capítulo 2</u> – Patotipos de <i>Escherichia coli</i> na suinocultura e resistência aos antimicrobianos..... | 13 |
| Resumo..... | 14 |
| Abstract..... | 15 |
| Suinocultura moderna e o uso de antimicrobianos | 16 |
| Infecções ocasionadas por <i>E. coli</i> nos suínos..... | 17 |
| Transferência da resistência em bactérias..... | 22 |
| Resistência de <i>E. coli</i> aos antimicrobianos..... | 24 |
| Impacto ambiental do uso de antimicrobianos na suinocultura | 26 |
| Perspectivas: Alternativas ao uso de antimicrobianos..... | 28 |
| Conclusão..... | 30 |
| Referências bibliográficas..... | 31 |
| <u>Capítulo 3</u> – Virulence factors, antimicrobial resistance and plasmid content of clinical and environmental <i>Escherichia coli</i> swine isolates from southern Brazil..... | 41 |
| Abstract..... | 43 |
| Introduction..... | 44 |
| Materials and Methods..... | 46 |
| Bacterial isolates and culture conditions | 46 |

| | |
|--|-----|
| Resistance to antimicrobial drugs | 46 |
| Total DNA extraction and PCR..... | 46 |
| Plasmidial DNA extraction..... | 47 |
| Statistical analysis..... | 47 |
| Results and Discussion..... | 48 |
| Acknowledgments | 51 |
| References | 51 |
| <u>Capítulo 4</u> – Virulence factors and antimicrobial resistance of <i>Escherichia coli</i> isolated from urinary tract of swine in southern Brazil..... | 58 |
| Abstract..... | 60 |
| Introduction..... | 61 |
| Materials and Methods..... | 63 |
| Bacterial strains and culture conditions..... | 63 |
| Resistance to antimicrobial drugs | 63 |
| Total DNA extraction and PCR | 63 |
| Plasmidial DNA extraction..... | 64 |
| Statistical analysis | 64 |
| Results and Discussion..... | 65 |
| References | 67 |
| <u>Capítulo 5</u> - Discussão..... | 76 |
| Referências Bibliográficas..... | 86 |
| <i>Curriculum vitae</i> resumido do autor..... | 101 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

| | |
|------------------|---|
| °C | Graus Celsius |
| - | Resultado negativo |
| µg | Micrograma |
| µl | Microlitro |
| µM | Micromolar |
| + | Resultado positivo |
| AEEC | <i>E. coli</i> (<i>Attaching effacing E. coli</i>) |
| AMI | Amicacina |
| AMP | Ampicilina |
| AMP _c | Adenilato fosfato cíclico |
| BFP | Pili formadora de vesícula (<i>Bundle forming pillus</i>) |
| CFL | Cefalexina |
| CLO | Cloranfenicol |
| CNF | Fator citotóxico necrosante (<i>Cytotoxic necrotizing factor</i>) |
| COL | Colistina |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| dNTPs | Mistura de nucleotídeos (A, C, G e T) |
| EAF | Fator de aderência de EPEC (<i>EPEC adherence factor</i>) |
| EDEC | <i>E. coli</i> associada a doença do edema |
| EHEC | <i>E. coli</i> entero-hemorrágica |
| EIEC | <i>E. coli</i> entero-invasiva |
| ELISA | Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>) |
| ENO | Enrofloxacina |
| EPEC ou PEPEC | <i>E. coli</i> enteropatogênia |
| ETEC | <i>E. coli</i> enterotoxigênica |
| ESP | Proteína secretada pela EPEC (<i>EPEC secreted protein</i>) |
| EUA | Estados Unidos da América |
| EXPEC | <i>E. coli</i> causadora de infecções extra-intestinais |
| F4 | Antígeno fimbrial do tipo K88 |
| F5 | Antígeno fimbrial do tipo K99 |

| | |
|-------|--|
| F6 | Antígeno fimbrial do tipo 987P |
| FLF | Florfenicol |
| GALT | Tecido linfóide associado ao intestino (<i>Gut associated lymphoid tissue</i>) |
| GEN | Gentamicina |
| GMPc | Guanilato fosfato cíclico |
| HAMR | Hemaglutinação não depende da presença ou ausência de manose |
| HAMS | Hemaglutinação dependente da ausência de manose |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgG | Imunoglobulina G |
| kb | Quilobase |
| KDa | Quilodalton |
| LEE | <i>Locus de Locus enterocyte effacement</i> |
| LT | Enterotoxina termolábil |
| M | Molar |
| MDR | Resistência múltipla as drogas (<i>Multi drug resistance</i>) |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| MMA | Mastite, metrite e agalactia |
| N | Número |
| NEO | Neomicina |
| ng | Nanograma |
| NOR | Norfloxacina |
| OMP | Proteínas externas de superfície (<i>Outer major proteins</i>) |
| pb | Par de base |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>) |
| pH | Potencial de hidrogênio |
| R | Resistente ou resistência |
| s | Segundo |
| SEPEC | <i>E. coli</i> septicêmica |

| | |
|---------------|--|
| SISCAL | Sistema intensivo de criação de suínos ao ar livre |
| STa e STb | Enterotoxinas termoestáveis do tipo A e B |
| STEC ou VETEC | <i>E. coli</i> produtora de toxina shiga |
| STx | Shiga toxina |
| SUT | Sulfazotrim |
| Taq DNA pol | DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i> (<i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase) |
| TET | Tetraciclina |
| Th1 | Linfócito T auxiliar do tipo 1 (<i>T helper type 1</i>) |
| Th2 | Linfócito T auxiliar do tipo 2 (<i>T helper type 2</i>) |
| TIR | Receptor translocado para intimina (<i>Translocated intimin receptor</i>) |
| TRI | Trimethoprim |
| U | Unidade |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| UPEC | <i>E. coli</i> uropatogênicas |
| USP | Proteína específica de <i>E. coli</i> uropatogênicas (<i>Uropathogenic specific protein</i>) |
| UTI | Infecções do trato urinário (<i>Urinary tract infections</i>) |
| UV | Ultravioleta |
| V | Volt |
| VT | Vero toxina |

LISTA DE TABELAS

Introdução

| | |
|---|---|
| Tabela 1. Principais patótipos de <i>E. coli</i> que ocasionam enfermidades nos suínos..... | 5 |
|---|---|

Capítulo 3

| | |
|---|----|
| Table 1. Distribution of virulence factors in neonatal colibacillosis, healthy feces and environment <i>E. coli</i> isolates..... | 56 |
| Table 2. Percent of resistant <i>E. coli</i> isolates from clinical, non-diarrheic pigs and environment to antimicrobial drugs..... | 57 |

Capítulo 4

| | |
|---|----|
| Table 1. Resistance patterns of urinary <i>E.coli</i> isolates from swine in Southern Brazil... | 73 |
|---|----|

Discussão

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Isolados de <i>E. coli</i> de origem urinária, entérica e ambiental demonstrando resistência simultânea aos grupos de antimicrobianos e presença de DNA plasmidial..... | 79 |
| Tabela 2. Perfil de fímbrias e toxinas amplificadas por PCR nos isolados de <i>E. coli</i> provenientes de suínos com diarreia..... | 82 |

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 4

| | |
|--|----|
| Figure 1. Antimicrobial drugs resistance patterns of urinary <i>E. coli</i> isolates from swine in Southern of Brazil..... | 74 |
| Figure 2: PCR amplification of UPEC genes..... | 75 |

RESUMO

A disseminação dos patógenos na criação dos suínos tem estimulado o uso de drogas antimicrobianas na prevenção das enfermidades. Entretanto, essa prática está associada à seleção de bactérias resistentes, além da presença de resíduos de antimicrobianos nos alimentos de consumo humano. Particularmente para *E. coli*, esse problema agrava-se, em face do curto intervalo entre gerações e a capacidade de troca da informação genética entre as bactérias, que ocorre, principalmente, pela presença de elementos genéticos móveis como os plasmídeos. Os objetivos da presente tese experimento foram realizar o isolamento, identificação, determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, bem como a caracterização patotípica e da presença de DNA plasmidial em isolados de *E. coli* obtidos de criatórios suínos dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. As amostras foram identificadas de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas, sendo então genotipificadas por PCR para determinação dos patotipos ETEC (F4, F5, F6, F18, ST e LT), STEC (*eae*, *Bfp* e *STx*) e UPEC (*sfa*, *pap*, *cnf*, *hly*, *iha* e *usp*). Em seguida, o perfil de resistência aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão em disco Kirby-Bauer modificado. A presença de DNA plasmidial foi avaliada pela técnica de lise alcalina. Foram obtidos 64 isolados clínicos de suínos com diarreia, sete isolados de fezes de suínos saudáveis e nove amostras de meio ambiente dos criatórios suínos (cinco de *swabs* das instalações, duas de rações, uma de inseto e uma da esterqueira). Nos casos de infecção urinária, foram isoladas 82 amostras de *E. coli*. A hemólise foi verificada em 31,48% (51/162) isolados clínicos, 2,47% (4/162) isolados de fezes de suínos saudáveis, 1,23% (2/162)

isolados do ambiente de criação e 2,47% (4/162) isolados obtidos de fêmeas com infecção urinária. Os fatores de virulência detectados por PCR nas *E. coli* de origem entérica e ambiental foram: STb 33,75% (27/80), LT 28,75% (23/80), F18 21,25% (17/80), F4 15% (12/80), STa 16,25% (13/80), F5 10% (8/80), F41 8,75% (7/80) e STx 2,5% (2/80), enquanto que nas *E. coli* de origem urinária foram observados: pap 10,97% (9/82), iha 9,75% (8/82), sfa 6,09% (5/82), F4 4,87% (4/82), F5 4,87% (4/82), F6 1,21% (1/82) e F41 1,21% (1/82) *hlyA* 10,97% (9/82), LT 8,53% (7/82), STa 7,31% (6/82) and STb 4,87% (4/82). A resistência aos antimicrobianos foi alta para todos os tipos de amostras, sendo que nos isolados entéricos e de ambiente esta foi maior para tetraciclina e sulfazotrim, enquanto que nas UPEC a maior resistência ocorreu para penicilina, lincomicina, eritromicina e tetraciclina. Os plasmídeos foram encontrados em 87,5% (70/80) dos isolados entéricos e ambientais e em 39,02% (32/82) das amostras de infecção urinária. Com o presente estudo observou-se que os fatores de virulência encontram-se amplamente distribuídos entre os isolados obtidos de leitões com diarréia. A resistência múltipla aos antimicrobianos foi verificada independente da fonte de isolamento. Esta pode estar associada em parte à presença de plasmídeos nos isolados. Desta forma torna-se importante que os técnicos estejam conscientes sobre a importância do uso racional dos antimicrobianos e o desenvolvimento de pesquisas a cerca de alternativas para controle da enfermidade, incluindo vacinas e probióticos.

ABSTRACT

The pathogens dissemination around the swine breeding increased the antimicrobial drug use for disease prevention leading to resistant bacteria selection and food residues. Mainly in *E. coli*, this problem is dangerous due the short time generation and the bacteria skills to horizontal transference of genetic information by plasmids. The goals of this study were to perform isolation, identification, determination of antimicrobial resistance patterns, and molecular characterization of *E. coli* strains, from swine production systems in Southern of Brazil. The samples were identified according to morphological and biochemical tests. The genotypification of different pathotype was performed by PCR. This way we characterized the *E. coli* isolates as: ETEC (F4, F5, F6, F18, ST and LT genes), STEC (*eae*, *Bfp* and *STx* genes) and UPEC (*sfa*, *pap*, *cnf*, *hly*, *iha* and *usp* genes). After, the resistance patterns were evaluated by modified Kirby-Bauer diffusion disk method. The plasmidial DNA presence was determined by alkaline lyses extraction. Sixty four samples from diarrheic piglets, seven from healthy pig feces, and nine from environment (five from facilities swabs, two from food, one from insect and one from waste) *E. coli* isolates were obtained. From the urinary tract, we isolated 82 *E. coli* strains from infected sows. The haemolysis was verified in 31,48% (51/162) of diarrheic piglets, 2,47% (4/162) of healthy pigs feces, 1,23% (2/162) environment and 2,47% (4/162) urinary *E. coli* isolates. The virulence factors detected by PCR in enteric and environment *E. coli* were: STb 33,75% (27/80), LT 28,75% (23/80), F18 21,25% (17/80), F4 15% (12/80), STa 16,25% (13/80), F5 10% (8/80), F41 8,75% (7/80) and STx 2,5% (2/80), while in urinary *E. coli* were: *pap* 10,97% (9/82), *iha* 9,75% (8/82), *sfa* 6,09% (5/82), F4 4,87% (4/82), F5 4,87% (4/82), F6 1,21% (1/82), F41 1,21% (1/82) *hlyA* 10,97% (9/82), LT 8,53% (7/82), STa 7,31% (6/82) and STb 4,87% (4/82). The antimicrobial resistance was high to all *E. coli* tested strains, being enteric and environment isolates more resistant to tetracycline and

trimethoprim:sulfamethoxazole, while in urinary infections. The highest resistance values were noticed to penicillin, lincomycin, erythromycin and tetracycline. Plasmids were encountered in 87,5% (70/80) of enteric and environment isolates and in 39,02% (32/82) of urinary ones. In conclusion, the present study verified the widely presence of virulence factors among *E. coli* isolates from diarrheic piglets. The multi -drug resistance was found no depending of *E. coli* source. This resistance may be in part associated to plasmid presence in *E. coli* from Southern of Brazil isolates. In this way the veterinary knowledge about the rational use of antimicrobial drugs and research about alternative techniques, as vaccination and probiotics is very important.

Capítulo 1
Introdução

INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade de grande importância para a economia mundial. No Brasil existem, atualmente cerca de 200 frigoríficos, que foram responsáveis pelo abate de 33,9 milhões de suínos no ano de 2004. Na região sul do país 23 suínos são terminados por matriz ao ano, cujo índice de produtividade é semelhante ao de grandes produtores mundiais de suínos, como Alemanha, EUA, Canadá e Dinamarca. Aproximadamente 65% da produção brasileira é destinada ao mercado interno, sendo que o consumo *per capita* brasileiro aumentou de 7,87Kg/hab/ano em 1988, para 12,1Kg/hab/ano em 2004 (ABIPECS, 2006). No mundo, o consumo da carne suína também vem aumentando cerca de 2% ao ano, desde 1970, quando era de 9,2Kg/hab/ano, sendo esperado que, até 2015, chegue a 17,9Kg/hab/ano. Mesmo assim, destaca-se que a China continua sendo o maior consumidor e produtor mundial de carne suína. O Brasil é o terceiro país em produção e o quinto em consumo. Nosso país é o terceiro maior exportador mundial, atrás da União Européia e do Canadá (PORKWORLD, 2006). A consolidação do Brasil como grande exportador da carne suína está diretamente ligada ao uso de tecnologias modernas, melhores índices de produtividade e qualidade do produto, bem como a adequação às exigências dos diferentes mercados importadores.

A produção brasileira de suínos tem sofrido várias modificações tecnológicas, como a maior intensificação na produção, melhorias genéticas e nutricionais, que objetivam a maior qualidade do alimento ofertado aos animais. Em 2016, o Brasil vai exportar 60% da soja mundial, o que garante alimento barato e em grande quantidade para os suínos. Depois de duas décadas de intenso trabalho, obteve-se uma melhoria na carne suína que refletiu numa redução de 31% na gordura, 10% do colesterol e 14% das calorias (ABIPECS, 2006). No entanto, com essas modificações tecnológicas houve uma maior predisposição dos animais ao estresse, o que propiciou a ocorrência de diversas enfermidades. Nesse contexto, as doenças respiratórias e entéricas têm destaque na suinocultura moderna, constituindo-se em um grande problema, pois se

mantêm, apesar dos esforços de técnicos e de pesquisadores ligados à suinocultura.

Escherichia coli é uma bactéria bacilar, gram negativa, anaeróbica facultativa, possuidora de flagelos peritríquios e cápsula. As colônias em meio sólido podem ser observadas após 24 horas de incubação e variam seu aspecto de rugoso a mucóide. Alguns isolados são hemolíticos em Ágar sangue. No Ágar Mac Conkey, estas bactérias fermentam a lactose, o que constitui uma importante característica que a diferencia de outros patógenos entéricos, como a *Salmonella* spp. A espécie é identificada fenotipicamente através de várias características bioquímicas, como ausência da enzima citocromo oxidase, produção de indol, redução de nitratos, fermentação da glicose e outros carboidratos, com produção de ácido e gás. Além destas a ausência da produção de H₂S em meios específicos também é característica de *E. coli* (QUINN *et al.*, 1994, STROHL *et al.*, 2004).

O intestino grosso, principalmente o cólon, é o habitat deste microrganismo, tanto no homem como nos animais. Logo, as fezes são a principal fonte de contaminação dos suínos dentro de uma granja. O número de *E. coli* no intestino grosso é de aproximadamente 10⁷ UFC por grama de conteúdo intestinal, sendo estas bactérias responsáveis por menos de 1% da contagem total de bactérias. Uma vez eliminadas no meio ambiente, essas bactérias podem sobreviver por longos períodos, que podem alcançar mais de 11 semanas, desde que em condições ideais, como baixa temperatura e umidade adequada (BURROWS & RANKIN, 1970; BERTSCHINGER & FAIRBROTHER, 1999).

A tipificação sorológica de *E. coli* é muito importante para classificação da espécie. Esta é fundamentada na presença de diferentes antígenos somáticos, capsulares, flagelares e fimbriais. Para determinação dos padrões de antígenos presentes em *E. coli* são utilizados anti-soros, contudo estes possuem uma aplicação limitada, pois estão disponíveis apenas para um grupo reduzido de cepas (BERTSCHINGER & FAIRBROTHER, 1999). Além dos antígenos descritos acima, vários outros fatores são considerados de grande importância à classificação bacteriana, em especial aqueles relacionados diretamente à

patogenicidade do microrganismo. Entre estes fatores, podemos citar exotoxinas, associadas à perda de líquidos no intestino, a endotoxina presente na parede celular, hemolisinas, sideróforos e adesinas (BERTSCHINGER & FAIRBROTHER, 1999).

Os principais patotipos responsáveis por enfermidades nos criatórios suínos são apresentados na tabela 1 sendo *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Shiga toxigênica ou verotoxigênica (STEC ou VETEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (CHOI & SCHIFFERLI, 2001, BRITO *et al.*, 2004, GYLES & FAIRBROTHER, 2004). Um conjunto particular de genes é necessário, para que a *E. coli* ocasione uma determinada enfermidade. Logo, conforme o padrão de genes associados à patogenicidade de um isolado, este pode ser classificado nos diferentes patotipos de *E. coli*. Esta caracterização pode também ser realizada por PCR, que permite definir com precisão o potencial patogênico de *E. coli* (TENG *et al.*, 2004). A genotipificação de isolados de *E. coli* pela técnica de PCR tem sido amplamente utilizada (SARIDAKIS *et al.*, 1997; BRITO *et al.*, 1999; SILVEIRA *et al.*, 2001; AMEZCUA *et al.*, 2002; BEIER *et al.*, 2005). Nas diarreias em leitões, os isolados patogênicos demonstram ao menos um dos seguintes fatores de virulência: fímbrias K88-F4, K99-F5, 987P-F6, F18, F107 e F41, e toxinas LT, STa e STb. Por outro lado, isolados obtidos de casos de doença do edema possuem a fímbria F18 e a toxina STx2e. As *E. coli* associadas a infecções urinárias apresentam geralmente as fímbrias F1, FP (operon *pap*) e os fatores de virulência CNF1 e CNF2, bem como a hemolisina codificada pelo gene *hlyA* (BRITO *et al.*, 2004). Cepas de *E. coli* obtidas de casos de infecções extra-intestinais normalmente são identificadas pela amplificação dos genes *lpaH*, responsável pela invasão sistêmica de *E. coli* intestinais (TENG *et al.*, 2004). A maior parte dos fatores de patogenicidade está agrupada em plasmídeos e podem facilmente ser transferido entre isolados. Segundo os mesmos autores a classificação de *E. coli* nos diferentes patotipos pode ser dificultada pela troca de genes entre diferentes isolados.

Tabela 1. Principais patótipos de *E. coli* que ocasionam enfermidades nos suínos.

| <i>Patótipo</i> | <i>Fatores de Virulência</i> | <i>Doença</i> |
|-----------------------------|--|-----------------------|
| ETEC | Toxina termoestável dos tipos a e b (STa e STb) | Colibacilose neonatal |
| | Toxina termolábil dos tipos I e II (LT I e LT II) | Diarréia pós-demame |
| | Fímbrias: F4, F5, F18, 987P e F41 | |
| EPEC – AEEC | Intimina (<i>eae</i>) | Diarréia pós-desmame |
| | Receptor translocado de intimina (<i>tir</i>) | |
| | Proteínas do sistema de secreção (<i>EspA</i> , <i>EspB</i> e <i>EspD</i>) | |
| | Enterotoxina (<i>EspC</i>) | |
| STEC – VETEC- EHEC- EDEC | Fímbria: F18a | Doença do Edema |
| | <i>Shiga-Like</i> Toxina ou Verotoxina (Stx2e ou VT) | |
| ExPEC – SEPEC – UPEC – EIEC | Aerobactina | Septicemias |
| EIEC | Fímbrias: P, S e X | Infecções urinárias |
| | Fator Necrotizante Citotóxico (CNF1 e CNF2) | |

ETEC: *E. coli* enterotoxigênica, EPEC: *E. coli* enteropatogênica, AEEC: *E. coli* *Attaching Effacing*, STEC: *E. coli* produtora de Shiga toxina, VETEC: *E. coli* verotoxigênica, EHEC: *E. coli* hemorrágica, EDEC: *E. coli* causadora da doença do edema, ExPEC: *E. coli* extra-intestinal, SEPEC: *E. coli* septicêmica, UPEC: *E. coli* uropatogênica, EIEC: *E. coli* entero-invasiva Fonte: Adaptado de CHOI & SCHIFFERLI, 2001; BRITO et al., 2004; GYLES & FAIRBROTHER, 2004.

Infecções ocasionadas por *E. coli* geram um grande impacto à suinocultura mundial. Elas podem ocorrer tanto em leitões, no caso da colibacilose neonatal e septicemias que ocasionam a morte de animais jovens. Nessas situações, a bactéria pode tanto ser um patógeno primário, como estar associada a outros agentes que comprometam a imunidade dos animais. Nas fêmeas adultas podem ser observadas diversas manifestações clínicas, como mastites, que podem afetar até 82% das porcas com agalactia e as infecções urinárias, onde a *E. coli* está

associada a diversos outros patógenos na etiologia inespecífica da enfermidade (BERTSCHINGER & FAIRBROTHER, 1999). A bacteriúria está associada a distúrbios reprodutivos, como a mastite-metrite-agalactia (MMA). Estas são comuns nas fêmeas de descarte, sendo que nestes casos a *E. coli* é a bactéria isolada com maior frequência (PORTO *et al.*, 2003).

As diarréias nos suínos não podem ser analisadas como um fenômeno unifatorial e sim dependente de diversos aspectos além da virulência bacteriana, como a pouca ingestão de colostro, contaminação ambiental, estresse, presença de receptores no intestino delgado dos leitões, entre outros. As porcas são consideradas a principal fonte de infecção para os leitões, sendo que a contaminação também pode ocorrer após a ingestão de bactérias presentes no meio ambiente (GYLES & FAIRBROTHER, 2004). Nos leitões, as enfermidades de maior relevância são as diarréias e a doença do edema. As diarréias ocorrem em animais neonatos e no pós-desmame estando associadas a patótipos específicos de *E. coli*, como ETEC e EPEC. As *E. coli* ETEC produzem diversos fatores de virulência, como fímbrias K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F107 (F18) e F41 e as exotoxinas termoestáveis (STa e STb) e termolábil (LT). A toxina LT se apresenta muito semelhante a toxina da cólera. As toxinas ST provocam uma elevação nos níveis celulares de GMPc, por ativar a enzima guanilato-ciclase, enquanto que a toxina LT, por estímulo da enzima adenilato-ciclase, acarreta um aumento no nível de AMPc (STROHL *et al.*, 2004). Estes dois sinalizadores (GMPc e AMPc) induzem uma hipersecreção de íons cloreto e água das células, o que impede absorção de sódio. Assim, ocorre uma alteração no balanço hidroeletrolítico nos enterócitos, que provoca a perda de água e eletrólitos pelo organismo, levando a diarréia e desidratações severas, que podem ocasionar índices elevados de mortalidade nas granjas (HENTON & HUNTER, 1994). O principal sinal clínico observado na colibacilose neonatal é a diarréia aquosa e amarelada, que provoca desidratação em até 24 horas. O diagnóstico da colibacilose neonatal é realizado pela análise dos sinais clínicos, dados epidemiológicos, sendo que não ocorrem lesões específicas na necropsia. O exame laboratorial é realizado pelo envio de conteúdo intestinal e fezes para o laboratório, a fim de ser realizado o isolamento e caracterização do agente

(SOBESTIANSKI *et al.*, 1999). A técnica de PCR demonstrou ser muito importante para caracterização da patogenicidade dos isolados (BERTSCHINGER & FAIRBROTHER, 1999).

A *E. coli* EPEC provoca uma diarreia moderada associada à má-absorção de nutrientes, devido ao encurtamento das microvilosidades intestinais observada num processo patogênico denominado de *attaching effacing* (AN *et al.*, 2000). Esta lesão é associada à presença de uma proteína denominada intimina, a qual se liga na superfície do enterócito. A intimina provoca um rearranjo nos filamentos de actina do citoesqueleto celular, levando a um encurtamento das microvilosidades e a formação de um pedestal onde a bactéria se aloja. Com isto, ocorre a perda da capacidade de absorção de nutrientes pelas células intestinais (GYLES & FAIRBROTHER, 2004, STROHL *et al.*, 2004).

A doença do edema é outra enfermidade de importância à suinocultura ocasionada por *E. coli* STEC. A mortalidade nos lotes pode chegar a 100%, entretanto em média esta é menor que 10%. Estas bactérias possuem uma alta relação evolutiva com as EPEC. Entretanto a STEC possui “shiga” toxinas, sendo importante nos suínos a presença da STx2e. Esta toxina é encontrada no genoma de um fago temperado, o qual é encontrado em diversos sorotipos de *E. coli*, bem como em outros membros da família Enterobacteriaceae (DOUGAN *et al.*, 2001; TOTH *et al.*, 2003). As fímbrias relacionadas à adesão de cepas causadoras da doença do edema são a F18a/b. Após a infecção e adesão ao trato intestinal, estes microrganismos multiplicam-se e produzem os sinais clínicos característicos da doença do edema (HENTON & HUNTER, 1994; MOXLEY, 2000). As “shiga” toxinas são produzidas e absorvidas para a circulação sistêmica. Os efeitos desta toxina estão envolvidos com a inativação da síntese protéica em células do endotélio vascular do intestino delgado, tecidos subcutâneos e encéfalo. Esta lesão nas células endoteliais, induz ao aparecimento do edema e sinais nervosos característicos da enfermidade (HENTON & HUNTER, 1994). A suscetibilidade dos animais à infecção por STEC é muito variável. A resistência natural à doença ocorre pela ausência de expressão de receptores (F18a/b) no intestino dos animais (MOXLEY, 2000). A doença do edema aparece normalmente de 4 a 14 dias após o desmame. Animais filhos de primíparas apresentam uma maior

predisposição, pois ocorre uma menor transmissão da imunidade passiva. Um ou mais animais podem ser encontrados mortos sem apresentar sinais evidentes. Além da mortalidade, outros sinais clínicos observados são incoordenação motora, cegueira, dispnéia, edema de pálpebras, paralisia, tremores, convulsões e movimentos de pedalagem. Geralmente o histórico e os achados clínicos são conclusivos, sendo que o exame histopatológico do encéfalo e isolamento puro de *E. coli* patogênica no intestino permite a confirmação do diagnóstico (SOBESTIANSKI *et al.*, 1999).

As infecções do trato urinário, também chamada muitas vezes de cistite, decorrem da penetração e multiplicação de microrganismos nas vias urinárias, podendo atingir todo aparelho urinário ou parte dele (SOBESTIANSKI *et al.*, 1999). As fêmeas suínas estão mais sujeitas a estas infecções, devido a fatores anatômicos, fisiológicos e de manejo, como a proximidade das extremidades distais dos tratos digestivo e urinário, o estresse hídrico e baias mal dimensionadas (SOBESTIANSKY *et al.*, 1991). As infecções do trato urinário dos suínos influenciam negativamente os índices de produtividade da suinocultura. Os prejuízos associados a esta doença estão ligados a doenças puerperais, infertilidade, gastos com medicamentos, redução de peso dos leitões e mortalidade (BRITO *et al.*, 2004). As infecções urinárias na porca geralmente evoluem sem manifestação de sinais evidentes, passando muitas vezes despercebidas pelo produtor e médico veterinário. Alguns dos sinais observados são apatia, febre, dificuldade de levantar e permanecer em estação, alteração na cor e cheiro da urina e descarga vulvar purulenta ou sanguinolenta. As alterações nas características físico-químicas e do sedimento da urina são muito importantes para detecção de animais enfermos. O exame bacteriológico com cultivo é utilizado para determinar o agente etiológico e no estabelecimento de uma terapia (SOBESTIANSKI *et al.*, 1999). As *E. coli* uropatogênicas (UPEC) são a principal causa de infecção do trato urinário em mulheres e são também associadas à morte e descarte de fêmeas suínas adultas (BRITO *et al.*, 1999; PORTO *et al.*, 2003). Segundo BRITO *et al.* (2004) como a *E. coli* é encontrada normalmente na urina de porcas saudáveis torna-se fundamental a caracterização de isolados patogênicos. Entre os fatores associados à patogenicidade de UPEC em

humanos e suínos estão a produção de hemolisinas, aerobactinas, fímbrias não hemaglutinantes (987P), de hemaglutinação dependente da ausência de manose (HAMS) e de hemaglutinação não-dependente da presença ou ausência de manose (HAMR), presença de cápsula, resistência ao soro e produção do fator citotóxico necrotizante (CNF) (SILVEIRA *et al.*, 2001, BRITO *et al.*, 2004). Nos seres humanos, a importância das chaperonas associadas à membrana externa da parede celular e formação de um biofilme no interior da vesícula urinária têm se mostrado importante para patogenia das UPEC (KAU *et al.*, 2005).

As drogas antimicrobianas (antibióticos e quimioterápicos) podem ser utilizadas tanto no tratamento de infecções nos animais, bem como aplicadas nas rações, para promover o crescimento e melhorar a eficiência alimentar do plantel (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 1998). Quando administradas em doses subclínicas na alimentação de animais aparentemente saudáveis estes medicamentos recebem o nome de promotores de crescimento. Essas drogas atuam no controle profilático de infecções pela destruição de bactérias patogênicas que realizariam aderência ao trato digestório e provocariam enfermidades. Da mesma forma inibiriam microrganismos competidores dos produtores de vitaminas. O controle de doenças subclínicas é fundamental para que os animais manifestem todo o seu potencial genético para crescimento e produção de carne (BARCELLOS, 2005).

Embora o uso destes fármacos seja muito importante na suinocultura, sua adoção descontrolada e abusiva tem alertado pesquisadores das áreas da saúde humana e animal, para os potenciais riscos envolvidos nestas práticas. Atualmente, são muitos patógenos humanos e animais com multi-resistência às drogas antimicrobianas reforçando as evidências de que a emergência destas bactérias está associada intimamente ao uso dos promotores de crescimento. A presença de resíduos de antibióticos nos alimentos também deve ser considerada, tendo em vista o desenvolvimento de reações de hipersensibilidade (WALLMANN, 2006). Esta preocupação também tem se estendido a outros setores da produção animal, como a aquicultura, especialmente nas regiões onde dejetos da produção suinícola são empregados para alimentação de peixes e camarões (CABELLO, 2006).

Um dos problemas relacionados à disseminação da resistência aos antimicrobianos, especialmente em *E. coli*, é o fato desta bactéria possuir um intervalo entre gerações muito curto e dispor de mecanismos de transferência de material genético. O principal mecanismo de transferência da multi-resistência aos antimicrobianos em *E. coli* parecem ser os plasmídeos. Estes elementos podem ser transferidos via conjugação entre duas bactérias pela formação de uma pili F. Associado a isto, os plasmídeos podem facilmente receber outros genes de resistência aos antimicrobianos via integração mediada por integrons e transposons (SHERLEY *et al.*, 2004). MORO *et al.* (2000) comprovaram que o estresse térmico aumenta a quantidade de *E. coli* no intestino dos animais, bem como facilita sua eliminação do trato digestório para o meio ambiente. Isto ocorre provavelmente pela redução no tempo de trânsito do conteúdo intestinal. A situação se torna preocupante especialmente nos criatórios suínos. Esta se justifica pela disseminação e contato das bactérias, tanto no trato digestório, como no ambiente da granja e até mesmo na água, onde os dejetos dos suínos são lançados sem o devido tratamento. Vários estudos têm demonstrado a maior resistência aos antimicrobianos de bactérias do meio ambiente, onde ocorre a produção animal intensiva, particularmente aqueles aonde os antimicrobianos são utilizados em maior quantidade (SCHMIDT *et al.*, 2000; DOCIC & BILKEI, 2003; HART *et al.*, 2004; HATHA *et al.*, 2005; PARVEEN *et al.*, 2006;). Esta habilidade da *E. coli* em colonizar e persistir em diferentes ambientes facilita o seu contato com o homem, o que pode significar um grande risco à saúde pública (BEIER *et al.*, 2005).

Esta situação tem preocupado e estimulado os pesquisadores à busca de alternativas para resolução deste problema, que vão desde o uso de microrganismos benéficos ao trato digestório, para competir com a flora intestinal patogênica, utilização de fitoterápicos e homeopatia para tratar e prevenir enfermidades nos suínos e até alterações profundas no manejo dos animais. O sistema intensivo de criação de suínos ao ar livre (SISCAL) vem ganhando espaço na suinocultura nacional, pois tem como prioridade o bem-estar animal, reduzir o estresse dos animais e desta forma a ocorrência de enfermidades, o que implica diretamente na diminuição do uso de agentes antimicrobianos (DALLA

COSTA *et al.*, 2001). Além disto, a pressão para retirada dos promotores de crescimento na suinocultura é grande por parte do mercado consumidor interno e principalmente externo. Desde 2006, a União Européia não permite a importação de carne de países onde sejam utilizados promotores de crescimento nos animais, o que tem forte reflexo sobre o produto brasileiro (SANTOS & GIL-TURNES, 2005).

Alternativa interessante ao uso dos promotores de crescimento, são as vacinas, que podem induzir uma forte imunidade nos leitões protegendo-os das enfermidades provocadas por *E. coli*. A imunidade colostrar via IgA e IgG é muito importante no controle da enfermidade e a vacinação é fundamental para que níveis adequados destas imunoglobulinas e outros fatores específicos como transferrinas e lactoferrinas sejam passados das porcas aos leitões, principalmente no caso das fêmeas de primeira cria (marrãs). Devido a grande variabilidade genética, antigênica e de virulência nos isolados de *E. coli* torna-se recomendável o uso de vacinas autógenas. Muitas das vacinas disponíveis para profilaxia e controle da colibacilose e doença do edema empregam a metodologia utilizada na biotecnologia. Podem ser utilizadas fímbricas e toxinas purificadas, bem como vacinas de DNA e subunidade protéicas (KEN & BILKEI, 2003; RIISING *et al.*, 2005; SIMIONATTO *et al.*, 2005). Concomitante a utilização das vacinas é fundamental a redução da contaminação ambiental que é realizada pela correta higiene das instalações (GYLES & FAIRBROTHER, 2004).

No Brasil, poucos são os estudos recentes envolvendo a caracterização molecular de isolados de *E. coli*, bem como contemplando a resistência destas bactérias aos agentes antimicrobianos (BRITO *et al.*, 2004). Este fato ressalta a importância de trabalhos visando à caracterização da patogenicidade dos isolados de *E. coli* no nosso país, bem como da determinação de sua resistência às drogas mais comumente empregadas na terapia e na prevenção de infecções à suinocultura brasileira. Estes dados são muito importantes para guiar os clínicos com relação as melhores opções terapêuticas para tratamento, controle e profilaxia da infecção por *E. coli* nos suínos, bem como auxiliar na escolha de cepas bacterianas adequadas à utilização na elaboração de vacinas, mais eficientes e com um menor impacto ambiental e à saúde pública.

Tendo em vista o exposto anteriormente, os objetivos do presente estudo são:

- Determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *E. coli* obtidos de casos clínicos (entéricos e urinários), de fezes de suínos saudáveis e do ambiente de granjas da região sul do país;
- Verificar a resistência múltipla aos antimicrobianos nos isolados;
- Determinar o conteúdo de DNA plasmidial nesses isolados;
- Caracterizar os principais patótipos encontrados nos isolados clínicos (entéricos e urinários), nas fezes de suínos saudáveis e no ambiente através da técnica de PCR multiplex;
- Produzir subsídios para adoção de uma antibioticoterapia racional, compreensão da epidemiologia da enfermidade e produção de vacinas de maior eficácia.

Capítulo 2
Patotipos de *Escherichia coli* na suinocultura e resistência aos
antimicrobianos

A ser submetido à revista Ciência Rural

PATOTIPOS DE *Escherichia coli* NA SUINOCULTURA E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS

Escherichia coli PATHOTYPES IN SWINE PRODUCTION AND ANTIMICROBIAL
DRUGS RESISTANCE

Mateus Matiuzzi da Costa^{1,2}, Shana de Souto Weber², Franciele Maboni³,
Andréia Inês Ferronato¹, Irene Silveira Schrank², Augusto Schrank², Marilene
Henning Vainstein², Agueda Castagna de Vargas^{3*}

Resumo

A suinocultura moderna tem propiciado a obtenção de índices produtivos positivos, entretanto tem predisposto os suínos a um grande número de doenças. O surgimento destas enfermidades estimulou o uso indiscriminado das drogas antimicrobianas na prevenção de infecções. *Escherichia coli* é um dos principais patógenos da suinocultura e se caracteriza pela grande resistência aos agentes antimicrobianos. A habilidade deste patógeno na transmissão horizontal da resistência aos antimicrobianos decorre de vários mecanismos genéticos e possui sérias implicações à saúde pública. Dentre os problemas associados à disseminação da resistência múltipla aos antimicrobianos, podemos citar a contaminação do homem e dos animais por bactérias patogênicas de difícil terapia, principalmente através dos alimentos e do ambiente contaminados. Esta revisão tem como objetivo abordar aspectos relevantes da *E. coli* relativos ao seu potencial patogênico em suínos e à sua resistência às drogas antimicrobianas. Além disto, também apresenta algumas das alternativas aos usos destes fármacos na suinocultura.

Palavras- Chave: *E. coli*, suínos, resistência, antimicrobianos, meio ambiente.

-
1. Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco (Campus Petrolina), Petrolina, PE, Brasil.
 2. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.
 3. LABAC, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

* Autor para correspondência:

Mateus Matiuzzi da Costa

Colegiado de Zootecnia - Universidade Federal do Vale do São Francisco

Rua da Simpatia, 179

CEP 56304-440, Petrolina - PE - Brasil

E-mail: mmatiuzzi@hotmail.com

Abstract

The modern porcine practice has provided positive results in pork meat production, however this practice predisposes the animals to a large number of diseases. The possibility to acquire the large variety of infectious diseases induced the pork producers the utilization of antimicrobials drugs, known as growth promoters. *Escherichia coli* is one of the most important pathogens in swine production systems e has been characterized by multi-resistance to antimicrobial drugs. The ability of these bacteria to horizontal spread of antibiotic resistance is associated to several genetic mechanisms and has many public health regards. Among the problems associated to spread of multi-resistance are the man and animal contamination with difficult therapy against pathogenic bacteria, mainly by contamination of their food and environment. This review aim to discuss important aspects related to the pathogenic potential of *E. coli* on swine and its resistance to antimicrobial drugs. Besides, we present some alternatives to antimicrobial drugs on swine production.

Key-Words: *E. coli*, swine, resistance, antimicrobial drugs, environment.

Suinocultura moderna e o uso de antimicrobianos

No Brasil, a partir da década de 70, a criação de suínos passou por diversas modificações. Através da intensificação na produção, de melhorias genéticas e nutricionais, uma melhor produtividade foi obtida. Porém, essa intensificação predispôs os animais ao estresse, trazendo um maior risco de aquisição de doenças (LOVEDAY, 1994). Mesmo com os esforços para controle das enfermidades gastro-intestinais, estas são responsáveis por inúmeras perdas na produção de suínos. As diarreias são principalmente observadas em neonatos e animais após o desmame. Enquanto as perdas econômicas associadas à mortalidade são evidentes, a redução no desempenho nem sempre é detectada pelo produtor, ocasionando prejuízos consideráveis (COOPER, 2000; WILLS, 2000).

Os antimicrobianos são amplamente utilizados para prevenir ou tratar infecções microbianas nos animais e no homem, sendo utilizados para acelerar o crescimento e desempenho dos animais, inclusive na aquicultura (KUMMERER, 2004). A veiculação de antimicrobianos nas rações de suínos tem sido bastante discutida (LA FUENTE et al., 2005). O uso abusivo destas drogas está associado a diversos problemas, como a presença de resíduos na carne e transmissão de bactérias resistentes para o meio ambiente, animais e o próprio homem, com risco potencial à saúde pública (DUNLOP et al., 1999; SCHMIDT et al., 2000, WHITE et al., 2006).

Dados norte americanos indicam que 40% do total de drogas antimicrobianas produzidas são utilizadas para alimentação animal, em especial dos suínos. A contaminação do meio ambiente constitui-se num sério risco,

principalmente a contaminação da água que recebe dejetos de suínos, bovinos e aves não tratados corretamente (PETERSEN et al., 2002). Tendo em vista que os ecossistemas humanos, suínos e bovinos são intimamente relacionados pelas cadeias produtivas de alimentos, a transferência de bactérias resistentes é muito importante, levando em conta não só o consumo de alimentos, como também o caráter ocupacional desta infecção (SCHROEDER et al., 2002).

Infecções ocasionadas por *E. coli* nos suínos

A colibacilose é a enfermidade entérica de maior impacto na suinocultura, especialmente em animais neonatos e no pós-desmame. Essa doença pode ser ocasionada por cepas enterotoxigênicas de *Escherichia coli* (ETEC). Para o desenvolvimento da enfermidade, as bactérias precisam aderir-se a mucosa intestinal e produzir uma ou mais enterotoxinas termolábeis (LT I e LT II), e termoestáveis (STa e STb), que levam ao desenvolvimento de diarreia e desidratação, podendo resultar na morte dos animais. Os tipos de fímbrias comumente associados com a doença nos animais domésticos são K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F41 e F18 (HENTON & HUNTER, 1994; DEAN-NYSTROM et al., 1997; GYLES & FAIRBROTHER, 2004). A maior prevalência da infecção e de morte em suínos ocorre no período de 12 horas até quatro dias após o nascimento (COOPER, 2000). A colibacilose neonatal ocorre pela ingestão de bactérias de origem materna e ambiental, ausência das defesas naturais, como flora normal do intestino e barreira gástrica, presença de receptores para fímbria nos recém-nascidos e a alta susceptibilidade dos animais às enterotoxinas produzidas por *E. coli* (GYLES & FAIRBROTHER, 2004). Associados a estes

fatores, a inadequada ingestão de colostro pelos leitões é considerada como um dos principais fatores predisponentes (HENTON & HUNTER, 1994).

O estresse e a redução nos níveis de anticorpos recebidos passivamente desempenham um importante papel na infecção por ETEC em suínos desmamados. O desmame altera a fisiologia dos animais e induz a uma elevação do pH estomacal, provocando redução na atividade bactericida gástrica (HENTON & HUNTER, 1994). A diarreia pós-desmame está associada à elevação do número de *E. coli* hemolíticas em relação às não-hemolíticas no trato gastrointestinal; decorrente principalmente pela troca da dieta dos leitões (COOPER, 2000; GYLES & FAIRBROTHER, 2004).

E. coli enteropatogênica (EPEC) também pode determinar um sério impacto à suinocultura por estar envolvida no desenvolvimento de diarreias neonatais e pós-desmame associadas à má absorção de nutrientes (AN et al., 2000). Contudo, poucos são os dados relativos a prevalência da infecção por esta bactéria nos suínos, em especial no Brasil. A importância clínica destas bactérias tem sido relatada em outras espécies animais, como ruminantes, cães, macacos e no próprio homem (BEAUDRY et al., 1996; SARIDAKIS et al., 1997; CARVALHO et al., 2003; NAKAZATO et al., 2004; TENG et al., 2004).

As *E. coli* EPEC aderem-se ao intestino delgado e grosso dos animais, produzindo uma lesão denominada *attaching effacing*. Neste processo, os enterócitos são degenerados e uma leve inflamação da lâmina própria pode ser observada, principalmente no íleo. O duodeno e o ceco são os locais onde ocorre a maior colonização (BERTSCHINGER & FAIRBROTHER, 1999; AN et al., 2000). A lesão de *attaching effacing* é caracterizada pela adesão de uma proteína

localizada na superfície da bactéria, denominada intimina, à superfície do enterócito. A intimina provoca um rearranjo no citoesqueleto da célula, particularmente nos filamentos de actina, levando a um encurtamento das microvilosidades dos enterócitos e a formação de um pedestal onde a bactéria se aloja. Com isto, ocorre a perda da capacidade absorptiva do epitélio intestinal (GYLES & FAIRBROTHER, 2004).

Os fatores de patogenicidade associadas à lesão de *attaching effacing* são codificados por uma ilha de patogenicidade denominada LEE (*locus enterocyte effacement*), a qual se constitui num *cluster* de genes com 35kb (PERNA et al., 1998). A LEE codifica importantes fatores para a aderência bacteriana, como a intimina, codificada pelo gene *eae*, bem como uma série de proteínas secretadas, as Esps (EPEC *secreted proteins*). Estas quando polimerizadas formam uma estrutura filamentosa semelhante a uma agulha, característica do sistema de secreção do tipo III. Por este sistema é injetado na célula hospedeira, um receptor para intimina, também presente na ilha de patogenicidade, denominado Tir (*translocated intimin receptor*) (AN et al., 2000; CLEARY et al., 2004). Várias adesinas têm sido estudadas como fatores de patogenicidade nas *E. coli* EPEC, porém a que tem demonstrado maior importância é a *Bundle forming pillus* (BFP). Esta fímbria, codificada por um plasmídeo (EAF-EPEC *Adherence Factor*) de cerca de 80kb, tem se mostrado importante para a interação célula-célula e a formação da microcolônia, bem como para a dispersão das bactérias deste arranjo. Estudos apontam que esta fímbria é muito importante para adesão inicial da bactéria aos enterócitos (CLEARY et al., 2004). Contudo, tanto amostras EAF+, quanto EAF – têm sido isoladas de *E. coli* envolvidas em diarreias no

homem (GIRÃO et al., 1999). Cepas atípicas de EPEC, que possuem homólogos da LEE, mas que diferentemente das demais, não apresentam plasmídeos contendo os genes de aderência, têm demonstrado aderência difusa (GARTNER & SCHMIDT, 2004).

Outra importante enfermidade, ocasionada por *E. coli* verotoxigênicas (STEC, VETEC ou EHEC) em leitões recém desmamados é a doença do edema. Estas *E. coli* possuem uma alta relação com as EPEC. As duas possuem a LEE, entretanto a STEC possui importantes *shiga* toxinas, sendo a STx2e considerada importante para suínos. Esta toxina é encontrada como parte do genoma de um fago temperado, o qual se integra ao genoma da célula hospedeira sendo encontrado em diversos sorotipos de *E. coli* e em outros membros da família Enterobacteriaceae (DOUGAN et al., 2001; TOTH et al., 2003). Depois de uma infecção inicial do trato intestinal, estes microrganismos se aderem e se multiplicam no interior do intestino delgado (HENTON & HUNTER, 1994; MOXLEY, 2000). A fímbria F18a/b está relacionada à adesão de cepas causadoras da doença do edema. Durante a multiplicação da bactéria, a *shiga* toxina é produzida e absorvida pela circulação sistêmica, onde induz a inativação da síntese protéica em células do endotélio vascular do intestino delgado, em tecidos subcutâneos e no encéfalo. A destruição das células endoteliais leva ao aparecimento do edema e de sinais nervosos característicos da enfermidade (HENTON & HUNTER, 1994). A suscetibilidade dos animais à infecção por EHEC varia, sendo relacionada a um mecanismo genético. A resistência natural à doença do edema ocorre pela não-expressão de receptores (F18a/b) no intestino dos animais (MOXLEY, 2000).

As infecções do trato urinário nada mais são do que a penetração e multiplicação de microrganismos nas vias urinárias. As fêmeas estão mais sujeitas a essas infecções devido a uma série de diferenças anatômicas e fisiológicas, tais como a proximidade entre o ânus e a vagina (SOBESTIANSKY et al., 1991). As infecções do trato urinário dos suínos influenciam negativamente os índices de produtividade da suinocultura. Os prejuízos associados a essas infecções estão ligados às doenças puerperais, infertilidade, gastos com medicamentos, redução de peso dos leitões e mortalidade (BRITO et al., 2004). As *E. coli* uropatogênicas (UPEC) são a principal causa de infecção do trato urinário em mulheres, e são também associadas à morte de fêmeas suínas (BRITO et al., 1999; PORTO et al., 2003). Segundo BRITO et al. (2004), como as *E. coli* são encontradas normalmente na urina de porcas saudáveis, torna-se fundamental a sua diferenciação de amostras patogênicas. Entre os fatores associados à patogenicidade de UPEC em humanos e suínos estão a produção de hemolisinas, aerobactinas, fímbrias não hemaglutinantes 987P (F6), fímbrias de hemaglutinação dependente da ausência de manose (HAMS), fímbrias não-dependentes da presença ou ausência de manose (HAMR), cápsula, resistência ao soro e produção do fator citotóxico necrotizante (CNF) (SILVEIRA et al., 2001; BRITO et al., 2004). Nos seres humanos, as chaperonas associadas à membrana externa da parede celular e a formação de um biofilme no interior da vesícula urinária têm-se mostrado importante à patogenia das UPEC (KAU et al., 2005).

Conforme HENTON & HUNTER (1994), a maioria das cepas patogênicas de *E. coli* isoladas de suínos são hemolíticas, sendo, no entanto, esta característica não verificada para as outras espécies domésticas. Na maior parte

dos casos, somente o isolamento de *E. coli* a partir de amostras de fezes e conteúdo intestinal pode não ser suficiente para o diagnóstico da enfermidade. Nestes casos, é necessária a biotipificação de fímbrias e toxinas. A biotipificação dos isolados pode ser realizada por soro-aglutinação, ELISA, imunofluorescência e PCR (genotipificação) (BRITO et al., 1999; WILLS, 2000; DO et al., 2006).

Transferência da resistência em bactérias

A resistência bacteriana às drogas tem sido tema de estudo por diversos pesquisadores, e constituindo-se em um grande desafio aos profissionais da área da saúde. A origem desta resistência nem sempre é clara (KRUSE & SORUM, 1994), muitos pensam que esta se desenvolve somente após o uso das drogas antimicrobianas, porém a grande variedade de genes envolvidos na resistência indica uma origem e evolução muito antiga. Dados de pesquisa apontam que estes genes estariam envolvidos com a proteção aos antibióticos produzidos por outras bactérias, como *Streptomyces* spp. presente no solo (SUMMERS, 1996; D'COSTA et al., 2006).

A transferência de genes entre as bactérias foi primeiramente descrita em 1928, em estudos de virulência de pneumococos em camundongos. Muitos dos genes adquiridos desta forma podem carrear informações deletérias às bactérias receptoras, reduzindo sua população, outras informações são neutras, enquanto algumas, que conferem vantagem seletiva aos microrganismos, podem ser carregadas por plasmídeos e disseminar-se rapidamente numa população bacteriana (THOMAS & NIELSEN, 2005).

A transformação é o processo pelo qual o DNA pode ser absorvido a partir do ambiente onde a bactéria se encontra. O DNA pode persistir por muitas horas ou dias no meio ambiente e ser incorporado por microrganismos aptos. A transformação natural envolve a competência da bactéria receptora, ou seja, permissividade à entrada do DNA exógeno. Esta capacidade já foi comprovada, em condições naturais, para *E. coli* (BAUR et al., 1996) e outras bactérias de solo, como *Pseudomonas stutzeri* e *Acinetobacter* sp. (VRIES et al., 2001). DNA puro com potencial para transferência pode ser obtido de diferentes fontes como solo, água, fezes, silagem, saliva humana, alimentos e rações (THOMAS & NIELSEN, 2005).

A conjugação envolve a troca de DNA por plasmídeos via formação de pili sexual ou pili F. A pili comunica o citoplasma de duas células e permite tanto a passagem de plasmídeos, como de segmentos de DNA cromossomal (SUMMERS, 1996). Os integrons são pequenos plasmídeos que utilizam outros maiores para sua replicação e transmissão, enquanto que os transposons são seqüências de DNA de replicação e transmissão integradas em um genoma. Estas duas moléculas são muito importantes para o desenvolvimento de resistência múltipla às drogas antimicrobianas (SHERLEY et al., 2004).

Tendo em vista os aspectos negativos da transferência de informação gênica entre as bactérias, não é surpreendente que exista uma série de obstáculos a serem vencidos para que estes eventos aconteçam. Entre estes podemos citar a exclusão de superfície, que é muito importante para conjugação, uma vez que reduz a receptividade à pili F e a presença de endonucleases, que reconhecem seqüências específicas do DNA exógeno e o clivam. Este último

processo é menos freqüente, pois quanto menor for a seqüência de DNA adquirido, menor será a probabilidade de ocorrência de sítios de clivagem (FROST et al., 1994; JELTSCH, 2003; THOMAS & NIELSEN, 2005). Além disto, o estabelecimento, a replicação, a transcrição e a tradução de seqüências estranhas ao hospedeiro também podem ser bloqueadas (THOMAS & NIELSEN, 2005).

Resistência de *E. coli* aos antimicrobianos

A *E. coli* é uma das espécies onde cepas multi resistentes aos antimicrobianos têm emergido rapidamente nos últimos anos (SHERLEY et al., 2004). Estudo realizado na Suíça com *E. coli* VETEC, têm apontado para uma resistência às tetraciclinas, sulfonamidas e estreptomicina, usadas indiscriminadamente na alimentação de suínos no país (STEPHAN & SCHUMACHER, 2001). Mesmos achados foram obtidos em amostras de animais submetidos ao abate em Portugal (PENA et al., 2004). DUNLOP et al. (1998), nos EUA, verificaram a presença de isolados com uma resistência de 71% à tetraciclina, mas esta foi considerada baixa, tendo em vista pesquisas de outros países onde esta droga é utilizada nas rações dos suínos. No Canadá, BOERLIN et al. (2005) demonstraram que existe uma grande diferença na resistência aos antimicrobianos entre isolados de ETEC e outros comensais.

E. coli é uma das principais espécies onde plasmídeos contendo genes envolvidos no processo de resistência múltipla aos antimicrobianos vêm sendo descobertos. Esta característica está relacionada a sua grande distribuição ambiental e propensão a albergar elementos genéticos móveis, em especial os

plasmídeos. A conjugação, transposição e recombinação são amplamente incriminadas com a evolução da resistência bacteriana às drogas antimicrobianas. Eventos de transposição e integração são importantes mediadores da resistência múltipla às drogas antimicrobianas dentro da família Enterobacteriaceae (SCHROEDER et al., 2002; SHERLEY et al., 2004). O uso de antimicrobianos não pode ser considerado a única pressão de seleção para bactérias resistentes. Os plasmídeos podem carrear genes com diferentes funções, tais como: fatores de virulência, adesinas, toxinas, resistência a metais pesados e genes de metabolismo de substratos incomuns (LAZZAR et al., 2003; SHERLEY et al., 2004). Desta forma, desinfetantes e suplementos alimentares podem apresentar uma importante força de seleção para bactérias resistentes em uma propriedade (YATES et al., 2004). Também a resistência a um antimicrobiano pode ajudar na co-seleção de resistências as outras drogas, nos casos de resistência múltipla aos antimicrobianos (BLICKWEDE & SCHWARZ, 2004). Plasmídeos contendo genes de resistência aos antimicrobianos e enterotoxinas são descritos, desta forma a resistência pode ser esperada em isolados clínicos (DUNLOP et al., 1999). No entanto, estudos realizados em bovinos têm apontado que estas características nem sempre são encontradas em associação (ORDEN et al., 1999; STEPHAN & SCHUMACHER, 2001; BETTELHEIM et al., 2003).

Em muitos casos a resistência a uma determinada droga pode se estender a outras ligadas geneticamente. Como exemplo temos a gentamicina, amplamente usada na suinocultura, cujo gene de resistência está localizado num plasmídeo, que também codifica caráter de resistência para tetraciclina, sulfonamidas e penicilinas (DUNLOP et al., 1999). Os mesmos autores alertam

para grande concentração de bactérias contendo estes plasmídeos nas fezes dos animais. Estudo realizado por BETTELHEIM et al. (2003) comprovou que em bovinos, como nos seres humanos, as mães são a principal fonte de contaminação de *E. coli* resistentes aos neonatos, e que estas bactérias fazem parte da microflora intestinal. O que também pode ser esperado para os suínos (GYLES & FAIRBROTHER, 2004).

Após o uso de uma droga antimicrobiana, principalmente as de amplo espectro, pode-se observar a elevação do percentual de cepas resistentes entre bactérias patogênicas e comensais (WHITE et al., 2006). Segundo DUNLOP et al. (1998), a redução no tratamento de animais com grupos de antimicrobianos de largo espectro pode auxiliar na redução da prevalência de *E. coli* resistentes em suínos. Porém, trabalho recente apontou que uma vez adquiridos os genes e elementos móveis responsáveis pela resistência, estes representam um custo muito baixo à bactéria. Desta forma, a *E. coli* tende a manter-se, indicando que a redução na resistência aos antimicrobianos pela remoção da pressão de seleção, ou seja, na alimentação dos animais com antibióticos, pode, no mínimo, ser um processo muito lento (ENNE et al., 2005). Desta forma é importante a manutenção de investimentos no sentido de conservar a sanidade dos animais, reduzindo a necessidade de antimicrobianoterapia (WALLMANN, 2006).

Impacto ambiental do uso de antimicrobianos na suinocultura

A contaminação do meio ambiente constitui-se num sério risco, principalmente a partir da água que recebe dejetos de suínos e aves tratados incorretamente (PETERSEN et al., 2002). Além disto, bactérias com pouca

patogenicidade para humanos, mas resistentes aos agentes antimicrobianos, podem passar esta característica para os patógenos humanos através de plasmídeos R (DUNLOP et al., 1999). Bactérias patogênicas para o homem podem ser disseminadas para o meio ambiente a partir de dejetos e podem ser encontradas contaminando águas superficiais, como rios e lagos. Estudos apontam uma relação entre a detecção de bactérias resistentes aos antimicrobianos e a presença de contaminação por esgoto nos rios (FERREIRA et al., 2003; KUMMERER, 2004). O dejetos suíno pode carrear inúmeros patógenos bacterianos humanos, como *Salmonella* sp., *E. coli* e *Campylobacter* sp. (VANOTTI et al., 2005). O tratamento dos dejetos suínos parece ser eficiente na redução nas contagens de *Salmonella* sp., contudo, particularmente a *S. Typhimurium*, pode ainda ser isolada (SCHMIDT & CARDOSO, 2003).

Em condições naturais em um rio não poluído existem pouquíssimas bactérias resistentes a antimicrobianos. Isto pode ser explicado pela ausência de uma pressão de seleção; contudo nos ambientes poluídos pela ocupação humana, a resistência aos antimicrobianos é frequentemente observada (MCARTHUR & TUCKFIELD, 2000; VILANOVA et al., 2004; SHEHANE et al., 2005). Os coliformes totais, coliformes fecais, presença de *E. coli* e *Enterococcus* sp. são utilizados como indicadores da qualidade microbiológica de águas e dos riscos à saúde pública (MEAYS et al., 2004).

A presença de *E. coli* e outros coliformes fecais na água indica a contaminação pelas fezes de animais, tais como os suínos e o do próprio homem (FEUERPFEL & STEZLER, 1992; QUINN et al., 1994). Estes microrganismos têm demonstrado uma grande habilidade em resistir a diversos esquemas de

tratamento de dejetos, sendo muitas delas resistentes aos antimicrobianos (VILANOVA et al., 2004). A principal fonte de contaminação da água por bactérias multi-resistentes é a presença de dejetos sólidos e líquidos de animais, bem como excrementos de origem humana (REINTHALER et al., 2003).

Um estudo reportou que muitos eventos de transmissão de plasmídeos de resistência em *E. coli* podem ocorrer na água superficial ou no esgoto. Esses eventos acontecem principalmente quando a concentração das bactérias for alta, o que maximizaria o contato e a possibilidade de conjugação (REINTHALER et al., 2003). Outros apontam que contagens superiores a 10^3 UFC/ml podem ser encontradas em unidades de tratamento de esgoto e estariam associadas a uma resistência bacteriana seis vezes superior ao esperado (STEZLER & ZIEGERT, 1988).

Perspectivas: Alternativas ao uso de antimicrobianos

Os problemas associados à utilização de drogas antimicrobianas na suinocultura têm despertado nos pesquisadores a busca por alternativas que diminuam os riscos de infecções nestes animais. Entre essas alternativas podemos citar os probióticos, prébióticos e acidificantes (LA FUENTE et al., 2005). Os probióticos são preparados com microrganismos vivos que atuam pela biorregulação da microbiota intestinal e estímulo da fisiologia intestinal através da produção de compostos, como vitaminas, enzimas e ácidos orgânicos (KRITAS & MORRISON, 2005). A presença de tais microrganismos no intestino tem sido associado à redução na contagem de *E. coli* hemolítica nos intestinos de leitões (SCHAREK et al., 2005). Além disto, estes agentes também são importantes

estimuladores do sistema imunológico do hospedeiro, em especial de imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina G (IgG) e da atividade dos macrófagos (KOENEN et al., 2004). Os prébióticos, como os ácidos graxos voláteis, são compostos que auxiliam o crescimento seletivo da microbiota intestinal não patogênica (LIU et al., 2003).

Os acidificantes atuam pela redução no pH, estimulando a proliferação de *Lactobacillus sp.* reduzindo a multiplicação de bactérias patogênicas, como *Salmonella sp.* e *E. coli*, no intestino (FRANCO et al., 2005; TSAI et al., 2005). Entre os principais ácidos orgânicos que servem de suplemento nas rações animais, podemos citar o acético, benzóico, cítrico, fórmico, fumárico, láctico, fosfórico, propiônico, sórbico e tartárico (LA FUENTE et al., 2005). Além das propriedades antimicrobianas, os acidificantes melhoram a digestibilidade de outros componentes, como proteínas e aminoácidos, melhorando a eficiência enzimática, sendo desta forma de grande importância à nutrição animal (BLANK et al., 1999).

A vacinação de porcas antes do parto tem sido de grande utilidade no controle da colibacilose (BERTSCHINGER & FAIRBROTHER, 1999). O colostro das fêmeas imunizadas contém quantidades suficientes de imunoglobulinas para proteção dos filhotes. Dentre estas, podemos citar a IgA e IgG, que desempenham o papel de proteger os filhotes na fase inicial de sua vida. Quanto maior o número de parições, maior a proteção transmitida da fêmea aos filhotes (NETO et al., 2001). Este fato é verdadeiro especialmente para fêmeas de primeira cria oriundas de propriedades, onde as enfermidades ocasionadas por *E. coli* são raras ou inexistentes (RIISING et al., 2005). Além disto, o colostro contém

fatores específicos como transferrinas e lactoferrinas, que auxiliam na prevenção das enfermidades ocasionadas por *E. coli* (HENTON & HUNTER, 1994). Vários trabalhos apontam a eficiência das vacinas para controle da colibacilose e da doença do edema (KEN & BILKEI, 2003). Muitas destas vacinas empregam tecnologia atuais, como o uso de fímbrias ou toxinas purificadas, e vacinas de DNA ou subunidade protéica (RIISING et al., 2005; SIMIONATO et al., 2005, LIANG et al., 2006). A estimulação oral dos leitões com fímbria purificada (F4) tem sido eficiente em estimular uma imunidade de mucosa nas placas de Peyer. Esta imunidade é muito importante, principalmente para redução da diarreia pós-desmame, que ocorre numa fase de vida dos animais, onde os anticorpos maternos transmitidos pelo colostro não são protetores (SNOECK et al., 2006).

A identificação dos fatores de virulência associados à patogênese da enfermidade, e as técnicas de DNA recombinante têm permitido o surgimento de vacinas mais eficientes na proteção dos animais. Nos casos de falhas vacinais, a caracterização dos isolados envolvidos e o uso de vacinas autógenas se apresentam muito importante (BERTSCHINGER & FAIRBROTHER, 1999). Conforme os mesmos autores, a prevenção das infecções intestinais por *E. coli*, em suínos, envolve a redução no número de *E. coli* patogênicas no meio ambiente através da adoção de boas práticas de higiene, melhora no manejo e provisão de uma imunidade completa aos animais.

Conclusão

Tendo em vista o discutido neste trabalho, podemos concluir que o uso indiscriminado de antimicrobianos na suinocultura pode apresentar sérios reflexos

à produção dos animais, à saúde pública e ao meio ambiente. Uma vez adquirida pela *E. coli*, a resistência aos antimicrobianos pode ser transmitida a outros isolados e mantida por um longo período de tempo. Logo, a conscientização dos técnicos é fundamental, bem como a realização de estudos com o objetivo de dimensionar este problema, aplicar e descobrir novas estratégias alternativas ou complementares ao uso racional de drogas antimicrobianas na suinocultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, H.Y. et al. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. **Microbial Pathogenesis**, v.28, n.5, p.291-300, 2000.

BAUR, B. et al. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.10, p.3673-3678, 1996.

BEAUDRY, M. et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.1, p.144-148, 1996.

BERTSCHINGER, H.U.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli* infections. In: STRAW, B.E. **Diseases of swine**. Iowa : Iowa State University Press, 1999. Cap.32, p.431-468.

BETTELHEIM, K.A. et al. Antibiotic resistance among verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and non-VTEC isolated from domestic animals and humans. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, n.2, p.155-162, 2003.

BLANK, R. et al. Effect of fumaric acid and dietary buffering capacity on ileal and fecal amino acid digestibilities in early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v.77, n.11, p.2974-2984, 1999.

BLICKWEDE, M.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of florfenicol-resistant *Escherichia coli* isolates from pigs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, n.1, p.58-64, 2004.

BOERLIN, P. et al. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p.6753-6761, 2005.

BRITO, B.G. et al. Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. **Veterinary Microbiology**, v.65, n.2, p.123-132, 1999.

BRITO, B.G. et al. Fatores de virulência presentes em amostras de *E. coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.645-652, 2004.

CARVALHO, V.M. et al. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (SPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.3, p.1225-1234, 2003.

CLEARY, J. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v.150, n.Pt 3, p.527-538, 2004.

COOPER, V.L. Diagnosis of neonatal pig diarrhea. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v.16, n.1, p.117-133, 2000.

D'COSTA, V.M. et al. Sampling the antibiotic resistome. **Science**, v.311, n.5759, p.374-377, 2006.

DEAN-NYSTROM, E.A. et al. Presence of F18ac (2134P) fimbriae on 4P-*Escherichia coli* isolates from weaned pigs with diarrhea. **Journal Vet. Diagn. Invest**, v.9, n.1, p.77-79, 1997.

DO, T.N. et al. Pathotypes and serogroups of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pre-weaning pigs in north Vietnam. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, n.1, p.93-99, 2006.

DOUGAN, G. et al. The *Escherichia coli* gene pool. **Current Opinion in Microbiology**, v.4, n.1, p.90-94, 2001.

DUNLOP, R.H. et al. Associations among antimicrobial drug treatments and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* of swine on 34 farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v.34, n.4, p.283-305, 1998.

DUNLOP, R.H. et al. Sampling considerations for herd-level measurement of faecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in finisher pigs. **Epidemiology Infections**, v.122, n.3, p.485-496, 1999.

ENNE, V.I. et al. Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, n.3, p.544-551, 2005.

FERREIRA, F.L. et al. Partial characterization of the polluting load of swine wastewater treated with an integrated biodigestion system. **Bioresource Technology**, v.90, n.2, p.101-108, 2003.

FEUERPFEL, I.; STEZLER, W. Presence of antibiotic-resistant coliform bacteria in the human intestinal flora. **Bundesgesundheitsbl**, v.35, p.61-65, 1992.

FRANCO, L.D. et al. Effect of combinations of organic acids in weaned pig diets on microbial species of digestive tract contents and their response on digestibility. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)**, v.89, n.3-6, p.88-93, 2005.

FROST, L.S. et al. Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. **Microbiology Reviews**, v.58, n.2, p.162-210, 1994.

GARTNER, J.F.; SCHMIDT, M.A. Comparative analysis of locus of enterocyte effacement pathogenicity islands of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.72, n.11, p.6722-6728, 2004.

GIRÃO, D.M. et al. Characterization of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains of the classical O55 serogroup by RAPD analysis. **Revista de Microbiologia**, v.30, n.4, p.1-6, 1999.

GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. In: GYLES, C.L. et al. *Escherichia coli* In: **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ames, Iowa : Iowa State University Press, 2004. p.193-214.

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

JELTSCH, A. Maintenance of species identity and controlling speciation of bacteria: a new function for restriction/modification systems? **Gene**, v.317, n.1-2, p.13-16, 2003.

KAU, A.L. et al. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, n.1, p.54-59, 2005.

KEN, C.; BILKEI, G. Effects of vaccination and of a phytogetic feed additive on postweaning mortality due to *Escherichia coli* and on piglet performance. **Veterinary Record**, v.153, n.10, p.302-303, 2003.

KOENEN, M.E. et al. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meat-type chickens. **British Poultry Science**, v.45, n.3, p.355-366, 2004.

KRITAS, S.K.; MORRISON, R.B. Evaluation of probiotics as a substitute for antibiotics in a large pig nursery. **Veterinary Record**, v.156, n.14, p.447-448, 2005.

KRUSE, H.; SORUM, H. Transfer of Multiple-Drug Resistance Plasmids Between Bacteria of Diverse Origins in Natural Microenvironments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.11, p.4015-4021, 1994.

KUMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, n.2, p.311-320, 2004.

LA FUENTE, J.M. et al. Aditivos zootécnicos: Alternativas a los antibióticos como promotores de crecimiento en porcino, In: XII Congresso da ASSOCIAÇÃO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2005, Fortaleza, CE. **Anais do XII congresso da ABRAVES**, 2005. p.96-127.

LAZAR, V. et al. Correlation between multiple antibiotic resistance and heavy-metal tolerance among some *E.coli* strains isolated from polluted waters. **Environmental Monitor Assessment**, v.85, p.87-98, 2003.

LIANG, W. et al. Oral immunization of mice with plant-derived fimbrial adhesin FaeG induces systemic and mucosal K88ad enterotoxigenic *Escherichia coli*-specific immune responses. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 46, p. 393-399, 2006.

LIU, Y.L. et al. Effects of fish oil supplementation on the performance and the immunological, adrenal, and somatotropic responses of weaned pigs after an *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge. **Journal of Animal Science**, v.81, n.11, p.2758-2765, 2003.

LOVEDAY, R.K. Porcine respiratory disease. In: COETZER, J.A.W. et al. **Infectious diseases of livestock**. Oxford University Press, 1994. p.1551-1553.

MCARTHUR, J.V.; TUCKFIELD, R.C. Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: Effects of industrial pollution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.9, p.3722-3726, 2000.

MEAYS, C.L. et al. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. **J. Environ. Manage.**, v.73, n.1, p.71-79, 2004.

MOXLEY, R.A. Edema disease. **Veterinary Clinicals North America: Food Anim Practice**, v.16, n.1, p.175-185, 2000.

NAKAZATO, G. et al. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic E-coli (EPEC). **Veterinary Microbiology**, v.101, n.4, p.269-277, 2004.

NETO, R.M. et al. Efeito da raça, dieta, época e ordem de parto na concentração de imunoglobulina G no colostro de suínos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.10, p.1295-1299, 2001.

ORDEN, J.A. et al. In vitro activities of cephalosporins and quinolones against *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic dairy calves. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.3, p.510-513, 1999.

PENA, A. et al. Antibiotic residues in edible tissues and antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal. **Food Additive Contamination**, v.21, n.8, p.749-755, 2004.

PERNA, N.T. et al. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, v.66, n.8, p.3810-3817, 1998.

PETERSEN, A. et al. Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.12, p.6036-6042, 2002.

PORTO, R.N.C. et al. Aspectos físicos químicos e microbiológicos da urina de matrizes suínas descartadas. **Ciência Rural**, v.33, n.2, p.319-324, 2003.

QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. London : Wolfe, 1994. 648p.

REINTHALER, F.F. et al. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. **Water Research**, v.37, n.8, p.1685-1690, 2003.

RIISING, H.J. et al. Protection against neonatal *Escherichia coli* diarrhoea in pigs by vaccination of sows with a new vaccine that contains purified enterotoxigenic *E. coli* virulence factors F4ac, F4ab, F5 and F6 fimbrial antigens and heat-labile *E. coli*

enterotoxin (LT) toxoid. **Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases Veterinary Public Health**, v.52, n.6, p.296-300, 2005.

SARIDAKIS, H.O. et al. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v.54, n.2, p.145-153, 1997.

SCHAREK, L. et al. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.105, n.1-2, p.151-161, 2005.

SCHMIDT, A.S. et al. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.11, p.4908-+, 2000.

SCHMIDT, V.; CARDOSO, M.R.I. Sobrevivência e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Salmonella sp.* isoladas em um sistema de tratamento de dejetos suínos. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.881-888, 2003.

SCHROEDER, C.M. et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.576-581, 2002.

SHEHANE, S.D. et al. The influence of rainfall on the incidence of microbial faecal indicators and the dominant sources of faecal pollution in a Florida river. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.5, p.1127-1136, 2005.

SHERLEY, M. et al. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.150, n.Pt 5, p.1539-1546, 2004.

SILVEIRA, W.D. et al. Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.43, n.6, p.303-310, 2001.

SIMIONATO, S. et al. Desenvolvimento e avaliação de novas estratégias de imunização contra colibacilose suína. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, p.84-90, 2005.

SNOECK, V. et al. The jejunal Peyer's patches are the major inductive sites of the F4-specific immune response following intestinal immunization of pigs with F4 (k88) fimbriae. **Vaccine**, v. 24, p. 3812-3820, 2006.

SOBESTIANSKY, J. et al. **Infecções urinárias na fêmea suína**. Concórdia, SC: EMBRAPA-CNPISA, 1991. 49p. (Circular Técnica 11).

STEPHAN, R.; S. SCHUMACHER Resistance patterns of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland. **Letters Applied Microbiology**, v.32, n.2, p.114-117, 2001.

STEZLER, W.; ZIEGERT, E. Occurrence of antibiotic-resistant coliforms in waste water of a sewage treatment plant. **Zentrabl. Mikrobiol.**, v.143, p. 415-423, 1988.

SUMMERS, D.K. **The biology of plasmids**. Cambridge : Blackwell Science, 1996. p.157.

TENG, L.J. et al. Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. **Journal of Microbiology Immunology Infection**, v.37, n.6, p.327-334, 2004.

THOMAS, C.M.; NIELSEN, K.M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.9, p.711-721, 2005.

TOTH, I. et al. Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a Shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.12, p.7242-7247, 2003.

TSAI, C.C. et al. Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, n.2, p.185-194, 2005.

VANOTTI, M.B. et al. Removal of pathogen and indicator microorganisms from liquid swine manure in multi-step biological and chemical treatment. **Bioresource Technology**, v.96, n.2, p.209-214, 2005.

VILANOVA, X. et al. The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n.2, p.279-288, 2004.

VRIES, J. et al. The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter sp.* by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. **FEMS Microbiology Letters**, v.195, n.2, p.211-215, 2001.

WALLMANN, J. Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 41, p. 81-86, 2006.

WHITE, D.G. et al. The national antimicrobial resistance monitoring system (NARMS). **NMC Annual Meeting Proceedings**, 2006, p. 56-60.

WILLS, R.W. Diarrhea in growing-finishing swine. **Veterinary Clinicals North America: Food Animal Practice**, v.16, n.1, p.135-161, 2000.

YATES, C.M. et al. High frequency transfer and horizontal spread of apramycin resistance in calf faecal *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, n.2, p.534-537, 2004.

Capítulo 3

**Virulence factors, antimicrobial resistance and plasmid content of
clinical and environmental *Escherichia coli* swine isolates from
Southern of Brazil.**

Submetido à revista Current Microbiology

Virulence factors, antimicrobial resistance and plasmid content of clinical and environmental *Escherichia coli* swine isolates from Southern of Brazil.

Running head: Virulence factors and antimicrobial resistance of *E. coli*

Mateus M Costa^{1,3}, Guilherme Drescher³, Franciele Maboni², Shana S Weber¹, Augusto Schrank¹, Marilene H Vainstein¹, Irene S Schrank¹, Agueda C Vargas²,

¹Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, C.P. 15005, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

³Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, CEP: 89820-000, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

Correspondence to Agueda C Vargas

Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria.

Prédio 44, sala 5137

CEP 97105-900 Santa Maria, RS.

Phone: (55) 55 3220 9391 Fax: (55) 55 3220 8257

E-mail: agueda@ccr.ufsm.br

Abstract

Escherichia coli infections account for significant economic losses in swine production around the world. Antibiotic therapy is widely used to control and prevent swine infections. However, the abusive consumption of these drugs associated to the presence of chemical residues in food and the spread of resistant bacteria to environment are the main factor of risks to public health. Here, we report virulence factors and antimicrobial resistance patterns from *E. coli* isolates from Southern of Brazil. A total of 80 *E. coli* isolates were evaluated, being 64 from clinical samples (intestinal content and fragments of organs from diarrheic piglets), 7 from feces of clinically healthy piglets and sows and 9 environmental samples (5 from facilities swabs, 2 from feed, 1 from insect and 1 from waste). Molecular characterization was performed by PCR detection of fimbriae and toxin genes and plasmid content determination. The isolates were also characterized according to their resistance or sensitivity to the following drugs: ampicillin, trimethoprim:sulfamethoxazole, tetracycline, amikacine, colistin, norfloxacin, florfenicol, enrofloxacin, cefalexin, trimethoprim, neomycin, chloramphenicol and gentamicin. From 80 *E. coli* isolates, 66.67% were classified as enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), 3.1% were shiga toxin producing *E. coli* (STEC) and 30.15% showed a non specific pattern and were unclassified. One fecal isolate from non-diarrheic piglet was classified as ETEC by PCR. Clinical isolates showed resistance mainly for tetracycline, trimethoprim:sulfamethoxazole. Plasmidial DNA was observed in 70 isolates, being 78.5 % of clinical isolates, 8.57% of non-diarrheic feces and 12.8% environment isolates.

Introduction

Neonatal colibacillosis is one of the important disease of swine herds around the world [6, 18]. Different pathotypes are associated with neonatal and post-weaning diarrhea as enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and Attaching Effacing or enteropathogenic *E. coli* (AEEC). The edema disease is caused by a Shiga toxin producing *E. coli* (STEC). These diseases are associated with high mortality rates in young piglets [10, 17]. ETEC adheres to small intestine by fimbriae (F4, F5, F6, F41 and F18) and produce enterotoxins (STa, STb and LT) that interact with enterocytes causing water and electrolytes hyper secretion, impairing nutrient absorption [1, 4]. The hemolysins are considered an important marker of ETEC virulence from swine [12]. The piglet contamination occurs from sow or environmental contact and the disease produces very high mortality rates in the first 12 hours of life. Host susceptibility is associated to several factors such as the presence of intestinal *E. coli* fimbriae receptors, poor hygiene, stress, and colostrum ingestion quantity [4].

Antimicrobials have been commonly used to control and prevent *E. coli* infections in swine herds [12, 17, 19]. However, the abusive administration of the antimicrobial drugs causes many problems as residual contamination of pork meat and potential risks for consumers [3, 14]. Considering that human, bovine and swine ecosystems are highly interconnected by food production chain, the dissemination of resistant bacteria should be avoided [22, 24, 27].

The occurrence of multi-resistant *E. coli* isolates has rapidly increased in recent years [28]. In swine, a survey performed in Sweden for the detection of STEC, showed the presence of strains with high resistance to tetracyclines, sulfamethoxazole and streptomycin, drugs widely used as grow promoters [29].

Similar results were also reported in *E. coli* isolates from beef cattle and poultry [18, 23]. Significant differences in antimicrobial susceptibility patterns was found between swine ETEC and commensal bacteria, showing that illness animals is a important source of resistant bacteria to healthy animals [7].

Plasmids carrying multiple drug resistance genes are frequently detected in *E. coli* [27, 28]. Plasmids may carry genes with different functions as: antibiotic resistance, adhesins, toxins, resistance to heavy metals and assimilation of unusual nutrients [28]. Therefore, the antimicrobial therapy may not be the unique selection pressure to raise resistant bacteria and the use of disinfectants could be considered important to co-selection of pathogenic resistant bacteria to antimicrobial compounds [31, 32]. The co-selection of genes coding for resistance and enterotoxin production was reported, as well as the multiple antimicrobial drugs resistance among clinical isolates [14]. In many cases the resistance to some antibiotic may be extended to the others [6, 16].

The drug resistance of *E. coli* isolates is a very important issue and this problem can only be solved by interdisciplinary efforts [30]. The correct use of antimicrobial therapy by clinicians is very important to reduce possible failures [10]. According to DUNLOP et al. [13], a reduction in the use of growth promoters can help to minimize the dissemination of resistant *E. coli* for both the environment and the man. However it has been demonstrated that once acquired by *E. coli* the resistance genes are not rapidly lost [15]. In our study, we characterized molecularly the virulence factors and drug resistance profile of swine *E. coli* isolates from Southern of Brazil.

Materials and Methods

Bacterial isolates and culture conditions

E. coli strains were isolated from clinical cases of neonatal colibacillosis (intestine contents and fragments of liver and lungs), from non-diarrheic piglets and sows feces, and from the environment (food, insects and facilities). Samples were collected from swine breeding farms in Southern of Brazil, in sterile bags and swabs and transported in Stuart modified medium at 4°C to the laboratory. The samples were streaked on ovine blood agar and Mac Conkey agar and kept at 37°C for 48 hours. Putative *E. coli* colonies were identified by morphology and biochemical tests according to Quinn et al. [26].

Resistance to antimicrobial drugs

The Kirby-Bauer disc diffusion test [2] was used to determine the resistance to antimicrobial drugs of *E. coli* isolates. The follow drugs were tested: ampicillin (10µg), trimethoprim:sulfamethoxazole (25µg), tetracycline (30µg), amikacine (30µg), colistin (25µg), norfloxacin (10µg), florfenicol (30µg), enrofloxacin (5µg), cefalexin (30µg), trimethoprim(25µg), neomycin (30µg), cloramphenicol (30µg) and gentamicin (30µg).

Total DNA extraction and PCR

Total DNA was extracted by boiling methodology. Briefly, pure cultures were suspended in sterile Milli-Q water, boiled for 5 min and immediately immersed on ice. After centrifugation at 13.000 rpm for 2 min, the DNA was recovered from the supernatant. The *E. coli* isolates were characterized by multiplex PCR for fimbrial and toxin genotypification by amplification of the follows regions: STa, STb, LT, STx

F4, F5, F6, F41 and F18, as previously described [11]. The presence of attaching effacing *E. coli* (AEEC) was evaluated, as described by Nakazato et al. [21]. The PCR reactions were performed in 25 μ L reactions containing 100ng of DNA template, primers (30pmol each), *Taq* buffer (10mM Tris, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂), 200mM dNTPs, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Cenbiot-Enzymes, UFRGS, Brazil). Amplification was performed in 35 cycles, of 45s at 94°C, 1 min at 55°C, and 45s at 72°C. After amplification, a 7 μ L aliquot was submitted to electrophoresis for 30 min at 100V in a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Amplification products were visualized and photographed under UV illumination. Amplification identities were confirmed by sequencing in an automated DNA sequencer MEGABACE 1000 using the Dynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

Plasmidial DNA extraction

Plasmidial extraction from *E. coli* isolates was performed by alkaline lysis, as previously described [5]. The presence of plasmidial DNA was confirmed by electrophoresis in 0.7% agarose gels. The plasmids were visualized and photographed under UV illumination.

Statistical analysis

The difference among the *E. coli* isolates resistance patterns was evaluated by Z test of two proportions with normal approximation. The level of significance of $\alpha = 0.05$ and the cut off point for $Z_{\alpha 5\%} = 1.96$ were adopted. The relationship among the frequencies of haemolysis and virulence factors was done by chi-square test.

Results and Discussion

We have analyzed 80 *E. coli* isolates, being 64 from clinical cases of *E. coli* infections, 7 from feces of clinically healthy piglets and sows and 9 from environmental samples (from facilities swabs (5), feed (2), insect (1) and waste (1)). The results of haemolysis in blood agar and PCR for fimbrial and enterotoxin determination in the *E. coli* isolates are summarized in Table 1. Haemolysis is normally a marker of virulence in *E. coli* [4]. In our study we found 57 hemolytic isolates, being 79.7% (51/64) of diarrheic piglets, 57.1% (4/7) from healthy pig feces and 22.2% (2/9) from environment (Table 1). The haemolysis show statistically relationship ($P < 0.05$) with detection of virulence factors by PCR.

From the 64 clinical isolates, 43 were classified as ETEC and two as STEC. Nineteen *E. coli* clinical isolates gave negative results in the multiplex PCR for virulence markers and could not be typified. One isolated from healthy piglet feces was classified as ETEC. None isolate was confirmed as AEEC in this study.

In the clinical isolates, the most prevalent virulence factors were STb (26), LT (23), F18 (17), F4 (12) and STa (13). Thirteen clinical isolates presented LT and STb genes, six isolates only the STb gene and six isolates the STa and STb genes. The detection of genes coding for all enterotoxins was observed in two isolates. According to Celemin et al. [9], the enterotoxin coding genes LT and STb, or LT, STa and STb are expected to be found in ETEC. Only in one isolate from non-diarrheic piglet feces was detected the STb gene by PCR. Therefore, *E. coli* isolates from healthy swine and environment samples show a lower pathogenic potential. The STb alone causes only lost of fluids on the piglets intestinal mucosa, without drastic effects proper of colibacillosis diarrhea [8]. However, the pathogenicity of ETEC may

be increased by associated infections with other intestinal pathogens [20]. New vaccines strategies are being developed, using fimbrial and enterotoxins purified from *E. coli* [4], therefore the knowledge of the molecular patterns of *E. coli* isolates is very important.

The determination of the pathogenic bacteria susceptibility patterns to antimicrobial drugs is important to guide the therapy, that will reduce the economic losses due to *E. coli* infections [10, 17]. The resistance patterns of *E. coli* isolates from Southern of Brazil are presented in Table 2. The majority of the clinical *E. coli* isolates revealed resistance to tetracycline and trimethoprim:sulfamethoxazole (significant effect $P < 0.05$) and very few isolates were resistant to florfenicol. These results are in accordance to others studies that evaluated the resistance patterns of *E. coli* isolates from slaughtered swine, specially related to resistance to tetracycline and trimethoprim:sulfamethoxazole [1, 3, 10, 17, 18, 23, 29].

Boerlim et al. [7] found a significant difference in antimicrobial susceptibility patterns among pathogenic and commensal *E. coli* isolates. In our study, the resistance was higher for all *E. coli* isolates tested and no significant ($P > 0.05$) differences were detected related to the source of these samples (diarrheic, non-diarrheic piglets and environment). The drugs tested in the present study are widely employed to animal production in Brazil. The improper veterinary use of these drugs increases the resistance to animal pathogenic bacteria and could generate impact to human health by food and feces residues from swine herds [22, 24, 27]. The potential risk of the dissemination of resistant bacteria from animal farming to the environment and the man was determined by detection and determination of conjugative plasmids in bacteria isolate from water [24], meat producing animals and man [27]. According to Wallmann [31], strategies to avoid the spread of resistance to

antimicrobial drugs involve the control of antimicrobial use in the food-producing chain.

In our work plasmid was observed in 55 (85.93%) clinical and 6 (85.71%) non-diarrheic feces and 9 (100%) environmental *E. coli* isolates (data not shown). The plasmid occurrence was higher among clinical isolates showing simultaneous resistance from 5 to 7 antimicrobial drugs. Plasmids in *E. coli* carry multiple resistance genes. The higher resistance of *E. coli* is related to wide distribution of bacteria and ability to maintain genetic mobile elements [6, 16, 27, 32]. The co-selection of resistance and enterotoxin production genes was reported, as well as the multiple antimicrobial drugs resistance among clinical isolates [14]. Many clinical and environmental *E. coli* isolates revealed multiple resistances even in the absence of plasmidial DNA. The resistance to antimicrobial drugs may be associated to others different genetic mechanisms. Chromosomal mediated resistance genes are described for several antimicrobial compounds, as enrofloxacin beta lactams and biocides, as clorexidine [3, 25].

Antimicrobial drugs have been used for decades to control swine diseases and improve animal performance [3, 12]. Our results demonstrate the resistance pattern to antimicrobials drugs in swine clinical, feces and environment *E. coli* isolates in Southern of Brazil. In part, these findings may be associated with plasmids, although this is matter for future studies. The majority of *E. coli* isolated was molecularly characterized as ETEC, by using a multiplex PCR technique. This information is important to guide clinicians about antimicrobial therapy choices and vaccine development and strategies to be adopted in Brazil.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação de Apoio a Tecnologia e Ciência – UFSM (FATEC). Mateus MatiuZZi da Costa was a recipient of a doctoral fellowship from Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

References

1. Amezcua R, Friendship RM, Dewey CE et al. (2002) Presentation of postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. *Can J Vet Res* 66:73-78
2. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC et al. (1996) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45:493-496
3. Beier RC, Bischoff KM, Ziprin RL et al. (2005) Chlorhexidine susceptibility, virulence factors, and antibiotic resistance of beta-hemolytic *Escherichia coli* isolated from neonatal swine with diarrhea. *Bull Environ Contam Toxicol* 75:835-844
4. Bertschinger HU, Fairbrother JM (1999) *Escherichia coli* infections. In: Straw BE (ed) Diseases of swine, Iowa, Iowa State University Press, pp 431-468
5. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523

6. Blickwede M, Schwarz S (2004) Molecular analysis of florfenicol-resistant *Escherichia coli* isolates from pigs. J Antimicrob Chemother 53:58-64
7. Boerlin P, Travis R, Gyles CL et al. (2005) Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. Appl Environ Microbiol 71:6753-6761
8. Casey TA, Herring CJ, Schneider RA et al. (1998) Expression of heat-stable enterotoxin STb by adherent *Escherichia coli* is not sufficient to cause severe diarrhea in neonatal pigs. Infect Immun 66:1270-1272
9. Celemin C, Rubio P, Echeverria P et al. (1995) Gene toxin patterns of *Escherichia coli* isolated from diseased and healthy piglets. Vet Microbiol 45:121-127
10. Choi C, Ham HJ, Kwon D et al. (2002) Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Korea. J Vet Med Sci 64:71-73
11. Costa MM, Silva MS, Spricigo DA et al. (2006) Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. Pesq Vet Bras 26:5-8
12. Docic M, Bilkei G (2003) Differences in antibiotic resistance in *Escherichia coli*, isolated from East-European swine herds with or without prophylactic use of antibiotics. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 50:27-30
13. Dunlop RH, McEwen SA, Meek AH et al. (1998) Associations among antimicrobial drug treatments and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* of swine on 34 farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. Prev Vet Med 34:283-305
14. Dunlop RH, McEwen SA, Meek AH et al. (1999) Sampling considerations for herd-level measurement of faecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in finisher pigs. Epidemiol Infect 122:485-496

15. Enne VI, Delsol AA, Davis GR et al. (2005) Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. J Antimicrob Chemother 56:544-551
16. Harada K, Asai T, Kojima A et al. (2006) Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs. Am J Vet Res 67:230-235
17. Hariharan H, Coles M, Poole D et al. (2004) Antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets and calves with diarrhea. Can Vet J 45:605-606
18. Hart WS, Heuzenroeder MW, Barton MD (2004) Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and enterococci associated with pigs in Australia. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 51:216-221
19. Kummerer K (2004) Resistance in the environment. J Antimicrob Chemother 54:311-320
20. Nakamine M, Kono Y, Abe S et al. (1998) Dual infection with enterotoxigenic *Escherichia coli* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus observed in weaning pigs that died suddenly. J Vet Med Sci 60:555-561
21. Nakazato G, Gyles C, Ziebell K et al. (2004) Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic E-coli (EPEC). Vet Microbiol 101:269-277
22. Parveen S, Lukasik J, Scott TM et al. (2006) Geographical variation in antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from swine, poultry, beef and dairy cattle farm water retention ponds in Florida. J Appl Microbiol 100:50-57

23. Pena A, Serrano C, Reu C et al. (2004) Antibiotic residues in edible tissues and antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal. Food Addit Contam 21:749-755
24. Petersen A, Andersen JS, Kaewmak T et al. (2002) Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. Appl Environ Microbiol 68:6036-6042
25. Piddock LJ, Ricci V, McLaren I et al. (1998) Role of mutation in the gyrA and parC genes of nalidixic-acid-resistant salmonella serotypes isolated from animals in the United Kingdom. J Antimicrob Chemother 41:635-641
26. Quinn PJ, Carter ME, Markey B et al. (1994) Clinical veterinary microbiology. Longon, Wolfe
27. Schierack P, Steinruck H, Kleta S et al. (2006) Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. Appl Environ Microbiol 72:6680-6686
28. Schroeder CM, Zhao CW, DebRoy C et al. (2002) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. Appl Environ Microbiol 68:576-581
29. Sherley M, Gordon DM, Collignon PJ (2004) Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. Microbiology 150:1539-1546
30. Stephan R, Schumacher S (2001) Resistance patterns of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland. Lett Appl Microbiol 32:113-117
31. Wallmann J (2006) Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. International J Med Microbiol, in press

32. Yates CM, Pearce MC, Woolhouse MEJ et al. (2004) High frequency transfer and horizontal spread of apramycin resistance in calf faecal *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 54:534-537

Tables

Table 1. Distribution of virulence factors in neonatal colibacillosis, healthy feces and environment *E. coli* isolates.

| Isolates | Virulence factors | | | | | | | | | | |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | <i>n</i> ^a | <i>H</i> ^b | <i>STa</i> ^c | <i>STb</i> ^c | <i>LT</i> ^c | <i>STx</i> ^c | <i>F4</i> ^c | <i>F5</i> ^c | <i>F6</i> ^c | <i>F41</i> ^c | <i>F18</i> ^c |
| Clinical | 64 | 51 | 13 | 26 | 23 | 2 | 12 | 8 | 0 | 7 | 17 |
| Non-diarrheic feces | 7 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Environment | 9 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 80 | 57 | 13 | 27 | 23 | 2 | 12 | 8 | 0 | 7 | 17 |

^a number of *E. coli* isolates

^b haemolytic in blood agar

^c PCR results for the fimbrial and toxins amplifications

Table 2. Percent of resistant *E. coli* isolates from clinical, non-diarrheic pigs and environment to antimicrobial drugs.

| Drug | Isolates | | |
|-------------------------------|----------------------|----------------------------------|------------------------|
| | Clinical (n = 64) | Non-diarrheic pigs feces (n = 7) | Environment (n = 9) |
| Ampicillin | 42.19 ^a | 42.86 ^{a,c} | 30.00 ^a |
| Trimethoprim:sulfamethoxazole | 62.50 ^{a,b} | 28.57 ^a | 40.00 ^a |
| Tetracycline | 68.75 ^{a,b} | 42.86 ^a | 60.00 ^a |
| Amikacine | 37.50 ^a | 42.86 ^a | 20.00 ^a |
| Colistin | 28.13 ^a | 42.86 ^a | 10.00 ^a |
| Norfloxacin | 35.94 ^a | 28.57 ^a | 20.00 ^a |
| Florfenicol | 12.50 ^{a,b} | 14.92 ^{a,c} | 00.00 ^{a,d} |
| Enrofloxacin | 29.69 ^a | 28.57 ^a | 20.00 ^a |
| Cefalexin | 43.75 ^a | 28.57 ^a | 40.00 ^a |
| Trimethoprim | 42.19 ^a | 14.29 ^a | 40.00 ^a |
| Neomycin | 32.81 ^a | 28.57 ^a | 50.00 ^a |
| Cloramphenicol | 20.31 ^{a,b} | 28.57 ^a | 20.00 ^a |
| Gentamicin | 39.06 ^a | 71.43 ^{a,c} | 60.00 ^a |

a: Non Statistically difference besides *E. coli* groups ($P>0.05$)

b: Statistically difference in clinical isolates group ($P<0.05$)

c: Statistically difference in non-diarrheic pig feces *E. coli* isolates ($P<0.05$)

d: Statistically difference in environment *E. coli* isolates ($P<0.05$)

n: number of isolates.

Capítulo 4

Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in Southern of Brazil.

A ser submetido à revista Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in Southern of Brazil.

M.M. Costa^{1,3}, G. Drescher³, F. Maboni², S.S. Weber¹, S.A. Botton², M.H. Vainstein¹, I.S. Schrank¹ and A.C. Vargas²

¹Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

³ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste de Santa Catarina - Campus Xanxerê, Xanxerê, SC, Brasil.

Molecular characterization and antimicrobial resistance of *E. coli*

E. coli, antimicrobial drugs, resistance, plasmid, UPEC, sows

Research supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação de Amparo a Tecnologia e Ciência – UFSM (FATEC). Mateus Matiuzzi da Costa was a recipient of a doctoral fellowship from Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Address for correspondence:

A.C. Vargas, LABAC, DMVP, CCR, UFSM

Prédio 44, sala 5137

97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

Fax: +55-55-3220-8257

E-mail: agueda@ccr.ufsm.br

Abstract

The urinary infections in sows are responsible for economic losses in Brazil. *Escherichia coli* is one of most frequent agent associated to urinary tract infections (UTI) in man and animals. Antimicrobial drugs are commonly used to threat and prevent UTI in swine herds. The present study has the purpose to determine the molecular and resistance patterns of *E. coli* isolates from urinary tract of swine in Southern of Brazil. Eighty two *E. coli* isolates from urinary vesicle and urine of sows

were evaluated. Molecular characterization of samples was performed by PCR detection of virulence factors from ETEC (F4, F5, F6, F18, F41, ST and LT), STEC (*ea*e, *Bfp* and STx) and UPEC (*sfa*, *pap*, *cnf*, *hly*, *iha*, *usp*). From a total of 82 *E. coli* isolates, thirty four (38.63%) harbored one or more virulence factors. The frequency of virulence factors genes detected by PCR were: *pap* (10.97%), *hlyA* (10.97%), *iha* (9.75%), LT (8.53%), STa (7.31%) *sfa* (6.09%), F4 (4.87%), F5 (4.87%), STb (4.87%), F6 (1.21%) and F41 (1.21%). Isolates were resistant to penicillin (n= 78), lincomycin (n= 77), erythromycin (n= 76), tetracycline (n= 74), amoxicillin (n= 68), ampicillin (n= 61), josamycin (n= 65), norfloxacin (n= 48), enrofloxacin (n= 47), gentamicin (n= 32), neomycin (n= 31), apramycin (n= 25), colistine (n= 25) and cefalexin (n= 5). A number of 32 (39.02%) *E. coli* isolates harbored plasmids. Virulence characteristics of both UPEC and ETEC and high resistance to antimicrobial drugs were found in *E. coli* isolated from swine urinary tract in Southern of Brazil.

Introduction

The urinary tract infection (UTI) is defined by the presence of bacteria in the urinary tract (1). The disease is associated to many factors, as microorganisms, husbandry, feeding, poor hygiene in housing and animal conditions (2). *Escherichia coli* is one of most important pathogen isolated from UTI and causing a significant percentage of death and discard of diseased sows (3).

In human, the disease is associated to many virulence factors present in the uropathogenic *E. coli* (UPEC), including haemolysin, aerobactin, adhesins, serum resistance, cytotoxic necrotizing factor (CNF), capsule production and uropathogenic-specific protein (4-6). *E. coli* adhesion to host cells is important to bacteria infection and persistence in urinary fluxes (7,8) and can be mediated by several types of fimbriae (2). Fimbriae associated to UPEC are classified by its haemagglutination activity, especially in human eritrocytes (9). *E. coli* fimbriae associated to UTI are the non-haemagglutinating 987P (F6) fimbria, mannose sensitive haemmagglutination type 1 fimbria and mannose-resistant haemagglutination P, M and S fimbriae. P and M types of fimbriae are associated with blood group antigen and the S type with sialic acid binding. The genes involved in biosynthesis of fimbria and adhesins present in UPEC are organized in operons denominated *pap* and *sfa*, coding for P and S fimbrial adhesins (10-12). *IrgA* homologue adhesin (*iha*) is an outer membrane protein (OMP) found mainly in UPEC and others extra-intestinal pathogenic *E. coli* being also involved in bacterial adherence (13).

Toxins produced by *E. coli* may cause inflammatory response of urinary infections (14). Two toxin types are associated to UPEC. The alfa-haemolysin (*hly*) and cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF 1) are involved in host cell destruction necessary to bacteria persistence in urinary tract (3,15). The presence of CNF 1 in *E. coli* is associated to reduction in reactive oxygens species release from host cells and mutation in *cnf* gene reduce the pathogenicity of UPEC (16). Toxins from enterotoxigenic *E. coli* were described in swine urinary *E. coli* isolates as heat-labile toxin (LT) and vero toxin (VT). However these toxins were not present in human isolates (3).

The antibiotic therapy is commonly used to control and prevent urinary infections in sows, but this practice may select resistant bacteria (1,2). The resistance to antimicrobial drugs may be carried by plasmids, as well as chromosomal mutations that occur spontaneously (17,18). Multi-drug resistance have been reported in human and swine *E. coli* isolated from urinary tract (3,18,19). The biofilm formation is responsible for persistent of *E. coli* in urinary infections and for the resistance to antimicrobial therapy in human (15,20). Bacteria forming biofilm are more resistant to antimicrobial drugs than in the planktonic free states, like was determined in other veterinary pathogens, as *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus*, (21). The purpose of the present study was to determinate the pathotype, the plasmidial DNA content and the patterns of resistance to antimicrobial drugs in *E. coli* isolates from swine females with UTI.

Materials and Methods

Bacterial strains and culture conditions

Eighty two *E. coli* strains were isolated from sows with urinary infections according to microbiologic and urinary physic chemical patterns (1). The *E. coli* were isolated from urinary vesicle and urine samples were collected from swine breeding farms in Southern of Brazil, in sterile bags and forward to laboratory at 4°C in Stuart modified medium. The samples were streaked on Blood agar and Mac Conkey agar. After 48 hours at 37°C, one putative *E. coli* colony was identified by morphology and biochemical tests according to Quinn et al. (22).

Resistance to antimicrobial drugs

The Kirby-Bauer disc diffusion test (23) was used to determine the resistance to antimicrobial drugs of *E. coli* isolates. The following drugs were tested: amoxicillin (10 µg), ampicillin (10 µg), tetracycline (30 µg), norfloxacin (10 µg), enrofloxacin (5 µg), cefalexin (30µg), neomycin (30 µg) and gentamicin (30 µg). penicillin (10 µg), lincomycin (2 µg), erythromycin (15 µg), apramycin (15 µg), josamycin (30 µg) and colistin (10 µg).

Total DNA extraction and PCR

Pure cultures were suspended in sterile ultra pure water, boiled for 5 minutes and immediately immersed on ice. After centrifugation at 13.000 rpm for 2 minutes, the DNA was recovered from the supernatant. The *E. coli* isolates were characterized by multiplex PCR for fimbrial and toxin genotypification by using the amplification of follow regions: STa, STb, STx, *cnf*, *hly*, LT, F4, F5, F6, F41, F18, *Bfp*, *ea*e, *sfa*, *pap*, *iha* and *usp*, as previously described (3,6, 12,24-27). The PCR methodologies were performed in 25 µL reactions containing 100 ng of DNA template, primers (30 pmol each), *Taq* buffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂), 200 µM dNTPs, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Cenbiot-Enzymes/UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil). Amplification was carried out in 35 cycles, of 45 s at 94°C, 1 min at 55°C, and 45 s at 72°C. One aliquot of 7 µL was submitted to electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide for 30 min at 100 V. Products were visualized and photographed under UV illumination. Amplicons identities were confirmed by sequencing in an automated DNA sequencer MEGABACE 1000 using the Dynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

Plasmidial DNA extraction

Plasmidial DNA extraction from *E. coli* isolates was performed by alkaline lysis, as previously described (3). The presence of plasmidial DNA was confirmed by electrophoresis in 0.7% agarose gels for one hour at 50 V. The plasmids were visualized and photographed under UV illumination.

Statistical analysis

The difference among *E. coli* isolates resistance patterns was evaluated by Z test of two proportions with normal approximation. The level of significance of $\alpha = 0.05$ and the cut off point for $Z_{\alpha 5\%} = 1.96$ were adopted.

Results and Discussion

The results of PCR genotyping of *E. coli* isolates are summarized in figure 1. From eighty two *E. coli* isolates, 34 (38.63%) harbored one or more virulence factor revealed by PCR amplification. UPEC were found in 14.63% (12/82), ETEC in 15.85% (13/82) and in 10.97% (9/82) were amplified virulence factors of both, ETEC and UPEC. Brito et al. (3) described the occurrence of ETEC and UPEC in swine with UTI. According to Russo and Johnson (28) the current *E. coli* pathotype classification are performed by a combination of virulence traits, and not by genetically source. However these genes may be horizontally transferred by genetic elements, like plasmids or lysogenic phage, leading to erroneous classification. ETEC were reported in swine urinary strains suggesting the ascending intestinal origin of UTI (3). The same observation was made by Starcic (29) that reports the isolation of UPEC in dogs with diarrhea.

The pathogenesis of urinary tract infections depends of the *E. coli* ability to adhere, persist and multiply in the host (2,15). The genes involved in bacteria adherence detected in our study were *pap* (10.97%), *iha* (9.75%), *sfa* (6.09%), F4 (4.87%), F5 (4.87%), F6 (1.21%) and F41 (1.21%). The *pap*, *iha* and *sfa* elements are reported as important to adhesion of UPEC (10,13). *Pap* gene was found in 54.8% of Brazilian UPEC isolates studied by Brito et al. (3), although in our study, the frequency of these gene was lower (10.97%). According to Brito (30) *afa*, *Bfp* and *sfa* adhesins were not found in UPEC isolates from Brazil. In our study we found *sfa* in 6.09% *E. coli* isolates. The F4 and F5 fimbriae genes were amplified alone or in association with virulence factors typical of UPEC.

The presence of haemolysis in blood agar was observed in four isolates, although the *hlyA* gene was detected by PCR in nine isolates. This difference may be associated to silent expression or mutation in *hly* genes in *E. coli* (31,32). Haemolytic *E. coli* isolates are considered highly virulent in human due to their ability to lyses of host red blood cells (5). According to Schimidt & Karch (31), the haemolysis in blood agar is not sufficient for *E. coli* characterization and other techniques, like PCR, are necessary. Brito et al. (3) reported the presence of 25.8% of haemolytic UPEC isolates; however Carr & Walton (33) did not find haemolysis in *E. coli* isolated from swine with urinary infections. In our study LT, STa and STb toxins genes commonly found in ETEC were detected, respectively, in 8.53%, 7.31% and 4.87% of *E. coli* isolates. LT was previously described in swine UPEC by Brito et al. (3).

Uropathogenic specific protein (USP) has been used to identify UPEC in human and pets (10,4). The presence of *usp* gene in dog and cat *E. coli* isolates permitted the proposition of the role these animals as an alternative reservoir for human UTI (6). In contrast, we amplified *usp* gene in only one *E. coli* isolated and

this may suggest genotypic differences among swine and human urinary *E. coli* isolates.

The resistance to antimicrobials drugs was disseminated among UPEC isolates (Figure 1). Brito et al. (3) report a higher resistance of swine UPEC to tetracycline and ampicillin. Multi-drug resistance in UTI *E. coli* isolates is a serious concern in human health, but in dog and cat is rare and associated always with recurrent infections (18,34). In swine UPEC 95.12% (78/82) were resistant to four or more antimicrobial groups (Table 1), that is characteristic of multi-drug resistance or MDR (18). The more frequent patterns of resistance were to beta lactam, lincomycin, tetracycline, quinolone, macrolide, aminoglycoside and polymixin groups (Table 1). Plasmids and other genetic elements, like integrons, may be encountered in UPEC and are associated to coding virulence factors and MDR (2,3,18). In our study plasmids were found in 39.02% (32/82) of *E. coli* isolates.

Some *E. coli* isolates maintain virulence factors of both ETEC and UPEC simultaneously, suggesting the elevated genetic relationship among urinary and intestinal strains. Multi-drug resistance was widely found in swine urinary isolates. This information is important to *E. coli* diseases understanding, as well as to suggest antimicrobial therapy choices.

References

1. Sobestiansky J, Barcellos D, Moraes N, Carvalho L, Oliveira S. *Clínica e patologia suína*. Goiânia: Art 3 impressos especiais; 1999.

2. Brito B, Vidotto M, Berbel M, Tagliari K. Fatores de virulência presentes em amostras de *E. coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. *Ciência Rural* 2004; 34: 645-652.
3. Brito BG, Leite DS, Linhares RE, Vidotto MC. Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. *Vet Microbiol* 1999; 65: 123-132.
4. Kurazono H, Yamamoto S, Nakano M, Nair GB, Terai A, Chaicumpa W, et al. Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. *Microb Pathog* 2000; 28: 183-189.
5. Silveira W, Benetti F, Lancelotti M, Ferreira A, Solferini V, Brocchi M. Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2001; 43: 303-310.
6. Kurazono H, Nakano M, Yamamoto S, Ogawa O, Yuri K, Nakata K, et al. Distribution of the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from companion animals and correlation with serotypes and size-variations of the pathogenicity island. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 797-802.
7. Gyles C, Fairbrother J. *Escherichia coli*. In: Gyles C, Thoen O, Prescott J (Editors), *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Ames: Iowa State University Press; 2004. p 193-214.
8. Chen SL, Hung CS, Xu J, Reigstad CS, Magrini V, Sabo A, et al. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 5977-5982.

9. Garcia E, Bergmans HE, Van den Bosch JF, Orskov I, Van der Zeijst BA, Gaastra W. Isolation and characterisation of dog uropathogenic *Escherichia coli* strains and their fimbriae. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1988; 54: 149-163.
10. Yuri K, Nakata K, Katae H, Tsukamoto T, Hasegawa A. Serotypes and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats. *J Vet Med Sci* 1999; 61: 37-40.
11. Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1189-1193.
12. Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Mora A, Balsalobre C, Munoa F, et al. Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. *Res Microbiol* 1997; 148: 745-755.
13. Johnson JR, Jelacic S, Schoening LM, Clabots C, Shaikh N, Mobley HL, et al. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infect Immun* 2005; 73: 965-971.
14. Marrs CF, Zhang L, Foxman B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic E. coli (UPEC) pathotypes?. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 252: 183-190.
15. Mysorekar IU, Hultgren SJ. Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 14170-14175.
16. Davis JM, Rasmussen SB, O'Brien AD. Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. *Infect Immun* 2005; 73: 5301-5310.

17. Doss SA. Chromosomally-mediated antibiotic resistance and virulence. *J Med Microbiol* 1994; 40: 305-306.
18. Rijavec M, Starcic EM, Ambrozic AJ, Reissbrodt R, Fruth A, Krizan-Hergouth V, et al. High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Curr Microbiol* 2006; 53: 158-162.
19. Gulsun S, Oguzoglu N, Inan A, Ceran N. The virulence factors and antibiotic sensitivities of *Escherichia coli* isolated from recurrent urinary tract infections. *Saudi Med J* 2005; 26: 1755-1758.
20. Soto SM, Smithson A, Horcajada JP, Martinez JA, Mensa JP, Vila J. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 1034-1036.
21. Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol* 2007; 121: 1-17.
22. Quinn P, Carter M, Markey B, Carter G. *Clinical veterinary microbiology*. London: Wolfe; 1994.
23. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 493-496.
24. Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Mora A, Balaguer L, Mourino M, et al. O serogroups, biotypes, and eae genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3101-3107.
25. Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC, Jr., et al. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence

- genes, iha and iron (*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infect Immun* 2000; 68: 3040-3047.
26. Nakazato G, Gyles C, Ziebell K, Keller R, Trabulsi LR, Gomes TA, et al. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Vet Microbiol* 2004; 101: 269-277.
27. Costa M, Silva M, Spricigo D, Witt N, Marchioro S, Kolling L, et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2006; 26: 5-8.
28. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 2000; 181: 1753-1754.
29. Starcic M, Johnson JR, Stell AL, van der GJ, Hendriks HG, van VC, et al. Haemolytic *Escherichia coli* isolated from dogs with diarrhea have characteristics of both uropathogenic and necrotoxigenic strains. *Vet Microbiol* 2002; 85: 361-377.
30. Brito B, Irino K, Vidotto M. Patotipagem e classificação sorológica de cepas de *Escherichia coli* isoladas de suínos com infecções urinárias-UPEC. *Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*. Gramado. Porto Alegre: SOVERGS; 2002.
31. Schmidt H, Karch H. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2364-2367.

32. Pimenta AL, Racher K, Jamieson L, Blight MA, Holland IB. Mutations in HlyD, part of the type 1 translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin. *J Bacteriol* 2005; 187: 7471-7480.
33. Carr J, Walton J. The characterization of *Escherichia coli* isolates from the porcine urogenital tract. The Hague. The Hague: IPVS; 1992. p 262-262.
34. Hagman R, Greko C. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from bitches with pyometra and from urine samples from other dogs. *Vet Rec* 2005; 157: 193-196.
35. Barcellos D, Sobestiansky J. *Uso de antimicrobianos em suinocultura*. Goiânia: Art 3 impressos especiais; 1998.

Table 1. Resistance patterns of urinary *E. coli* isolates from swine in Southern Brazil.

| Resistance pattern | Number of isolates |
|---------------------------------------|--------------------|
| B-lac+linc | 3 |
| B-lac+linc+mac | 1 |
| B-lac+tet+quin+mac | 1 |
| B-lac+linc+mac+pol | 1 |
| B-lac+quin+linc+mac | 1 |
| B-lac+tet+linc+mac | 11 |
| B-lac+tet+linc+mac+amino | 2 |
| B-lac+tet+linc+mac+clo | 4 |
| B-lac+tet+quin+linc+mac | 5 |
| B-lac+tet+linc+mac+pol+clo | 1 |
| B-lac+tet+quin+mac+amino+clo | 1 |
| B-lac+tet+linc+mac+amino+clo | 2 |
| B-lac+tet+linc+mac+amino+pol | 2 |
| B-lac+tet+quin+linc+mac+amino | 2 |
| B-lac+tet+quin+linc+mac+pol | 3 |
| B-lac+tet+quin+linc+mac+clo | 6 |
| B-lac+tet+linc+mac+amino+pol+clo | 1 |
| B-lac+tet+quin+linc+mac+pol+clo | 1 |
| B-lac+tet+quin+linc+mac+amino+pol | 5 |
| B-lac+tet+quin+linc+mac+amino+clo | 20 |
| B-lac+tet+quin+linc+mac+amino+pol+clo | 10 |

B-lac: beta lactam, tet: tetracycline, quin: quinolone, linc: Lincomycin, mac: macrolyde, amino: aminoglycoside, pol: polymixin, clo: cloramphenicol (35).

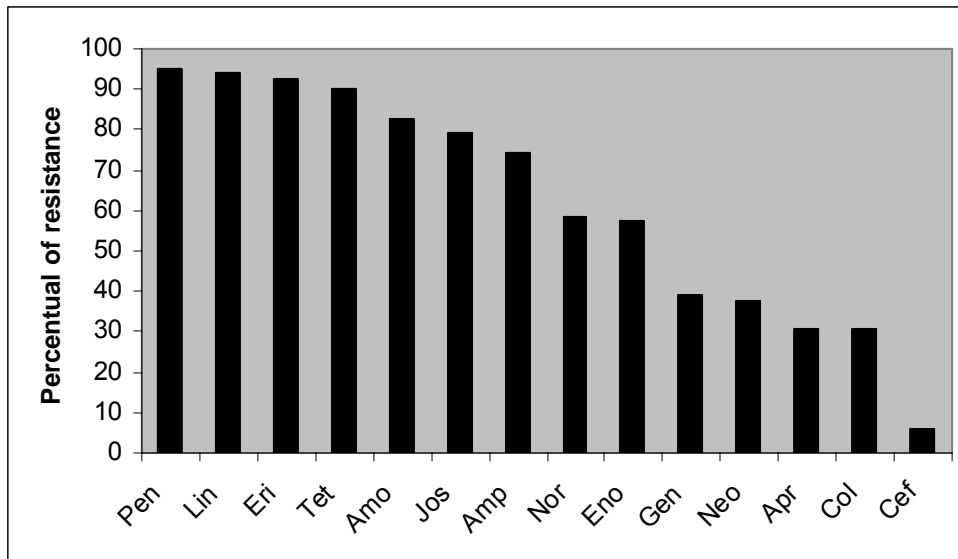


Figure 1. Antimicrobial drugs resistance patterns of urinary *E. coli* isolates from swine in Southern of Brazil. Penicillin (Pen), Lincomycin (Lin), Erythromycin (Eri), Tetracycline (Tet), Amoxicillin (Amo), Josamycin (Jos), Ampicillin (Amp), Norfloxacin (Nor), Enrofloxacin (Eno), Gentamicin (Gen), Neomycin (Neo), Apramycin (Apr), Colistin (Col) and Cefalexin (Cef).

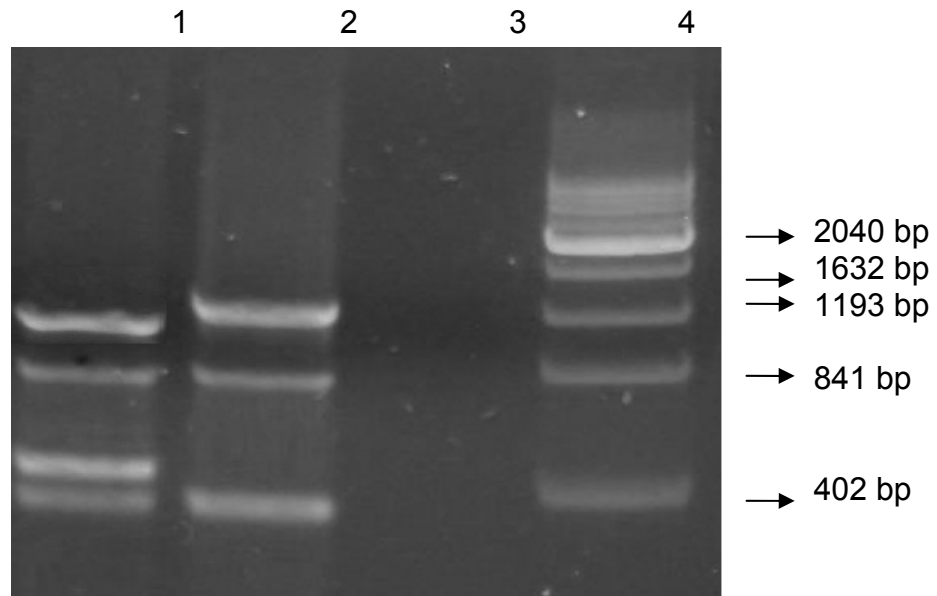


Figure 2. PCR amplification of UPEC genes. Lane 1 (from the top to the bottom): sample presenting *usp* (1000 bp), *iha* (827 bp), *sfa* (410 bp) and *pap* (328 bp), Lane 2 (from the top to the bottom): sample presenting *hly* (1117 bp), *iha* (827 bp) and *pap* (328 bp), Lane 3: negative control and Lane 4: 400bp DNA Ladder.

Capítulo 5

Discussão

DISCUSSÃO

A suinocultura brasileira caracteriza-se pela grande intensificação na produção, a qual tem garantido ao Brasil lugar de destaque na suinocultura mundial. Esta intensificação tem predisposto os animais a diferentes enfermidades, principalmente pelas condições de manejo que trabalham com a alta lotação animal, induzindo a um acúmulo de dejetos e gases tóxicos e redução na imunidade dos suínos. A infecção por *Escherichia coli* está entre as principais preocupações para os suinocultores no mundo. Estes microrganismos possuem uma ampla distribuição nos diferentes hospedeiros e no meio ambiente, bem como apresentam multi-resistência aos antimicrobianos (PARVEEN *et al.*, 2006, PATERSON *et al.*, 2006). Diversas manifestações são observadas nos suínos enfermos, entre elas diarreias (colibacilose neonatal e diarreia pós-desmame), sinais nervosos (doença do edema), cistite (infecção urinária) e outras infecções extra-intestinais (GYLES & FAIRBROTHER, 2004). Nas infecções urinárias, os prejuízos podem acarretar perdas de 160 dólares por porca enferma antes e após o parto, devido, principalmente a gastos com medicamentos e redução no número de leitões e mortalidade de leitões (SOBESTIANSY *et al.*, 1999).

Visando uma maior produtividade e a prevenção de doenças bacterianas nos plantéis suínos, drogas antimicrobianas vêm sendo empregadas. O uso indiscriminado destes fármacos pode acarretar graves problemas, que vão desde a contaminação dos produtos de origem animal por antimicrobianos até a seleção de bactérias resistentes, que podem facilmente chegar ao ser humano através da cadeia produtiva da carne suína e seus derivados (WALMANN, 2006, WHITE *et al.*, 2006). Esta contaminação pode ocorrer, também, através de rios ou peixes contaminados

por dejetos dos animais contendo bactérias resistentes (PARVEEN *et al.*, 2006). O entendimento de todos os aspectos relacionados à resistência bacteriana, sejam estes ecológicos, genéticos e bioquímicos são fundamentais para a busca de alternativas que objetivem reduzir o problema (WHITE *et al.*, 2006). Desta forma somente com uma visão interdisciplinar será possível minimizar os riscos associados à antibioticoterapia convencional (WALMMAN, 2006).

No presente estudo a resistência aos antimicrobianos foi observada em todos os isolados, tanto de amostras clínicas (entéricas e urinárias) como de fezes de suínos saudáveis e do ambiente de criação, o que demonstra uma grande disseminação da resistência ao longo dos anos em diferentes propriedades nos estados do sul do Brasil. A resistência simultânea também foi observada em nosso estudo e pode ser visualizada na Tabela 1.

Em nosso estudo, 95,12% (78/82) isolados de *E. coli* de origem urinária e 63,75% (51/80) isolados de origem entérica e ambiental apresentaram resistência a mais de três grupos de drogas antimicrobianas testadas. Este critério é considerado fundamental para o estabelecimento da resistência múltipla (RIJAVEK *et al.*, 2006). A multi-resistência pode ser mediada e transmitida por plasmídeos, os quais foram detectados em nossos experimentos, tanto em isolados de *E. coli* entéricos, de meio ambiente e urinários (Tabela 1). Os plasmídeos são considerados os principais elementos genéticos móveis de transmissão de resistência nas enterobactérias (SHERLEY *et al.*, 2004, PATERSON *et al.*, 2006, RIJAVEK *et al.*, 2006).

Tabela 1. Isolados de *E. coli* de origem urinária, entérica e ambiental, demonstrando resistência simultânea aos grupos de drogas antimicrobianas e presença de plasmídeos.

| Resistência múltipla | |
|-------------------------|---|
| <i>E. coli</i> urinária | <i>E. coli</i> intestinal e meio ambiente |

| Número de grupos de antimicrobianos* | presença de plasmídeo | ausência de plasmídeo | Total | presença de plasmídeo | ausência de plasmídeo | Total |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| 2 | 0 | 2 | 2 | 11 | 0 | 11 |
| 3 | 1 | 0 | 1 | 14 | 0 | 14 |
| 4 | 5 | 9 | 14 | 12 | 4 | 16 |
| 5 | 6 | 5 | 11 | 20 | 4 | 24 |
| 6 | 8 | 9 | 17 | 9 | 1 | 10 |
| 7 | 9 | 18 | 27 | 2 | 0 | 2 |
| 8 | 3 | 7 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 32 | 50 | 82 | 71 | 9 | 80 |

*Grupos de antimicrobianos testados segundo BARCELLOS & SOBESTIANSKY

(1998): beta lactâmicos: Penicilina, ampicilina, cefalexina, amoxicilina; Quinolonas: Norfloxacina, enrofloxacina; Tetraciclina; Lincomicina; Aminoglicosídeos: Gentamicina, neomicina, apramicina, amicacina; Sulfazotrim; Trimetoprim; Macrolídeos: Josamicina, eritromicina; Polimixina: Colistina; Cloranfenicol: Cloranfenicol e florfenicol.

As drogas as quais as bactérias apresentaram maior resistência foram a tetraciclina e sulfazotrim para isolados obtidos de leitões enfermos, leitões sadios e seu ambiente. Nos isolados obtidos de fêmeas com infecção urinária a penicilina, lincomicina, eritromicina e tetraciclina demonstraram alta resistência ($P < 0,05$). Estes compostos antimicrobianos possuem grande uso na suinocultura brasileira (BARCELOS & SOBESTIANSKI, 1998). O uso das drogas antimicrobianas de modo indiscriminado tem sido relatado por diversos estudos como uma forte pressão de seleção, que está associada a resistência tanto de bactérias patogênicas, como das comensais (DUNLOP *et al.*, 1998; PARVEEN *et al.*, 2006; WHITE *et al.*, 2006). Nos isolados analisados neste trabalho, a resistência às drogas antimicrobianas foi maior (estatisticamente significativa, $P < 0,05$) nos isolados de *E. coli* obtidos de fêmeas com infecção urinária. O isolamento de bactérias resistentes às drogas antimicrobianas de casos de infecções urinárias recorrentes tem sido um problema tanto para medicina humana, bem como para a veterinária (HAGMAN & GREKO, 2005,

ZHANEL, *et al.*, 2006). Um dos fatores associados ao difícil tratamento de infecções ocasionadas por *E. coli* no trato urinário é a formação de biofilmes (SCHREMBI *et al.*, 2003, SOTO *et al.*, 2006). A organização das células nos biofilmes se dá pela formação de uma matriz de biopolímeros que envolve as bactérias e as une a uma determinada superfície. Este arranjo é associada à troca horizontal de material genético e resistência, tanto as drogas antimicrobianas, como aos radicais livres produzidos pelos neutrófilos (SOTO *et al.*, 2006).

Os dados acima apresentados reforçam a idéia de que os profissionais de medicina veterinária e outros relacionados à área de produção animal, devem aplicar seus conhecimentos com a finalidade de estabelecer uma antibioticoterapia racional e busca de alternativas para minimizar o uso destes fármacos na produção animal. Entre estas alternativas encontram-se os probióticos. Probióticos são descritos como organismos vivos que quando administrados de modo adequado ajudam a manter a saúde do hospedeiro (De ANGELIS *et al.*, 2006). Estes microrganismos influenciam de modo positivo a colonização do intestino, bem como o estímulo do sistema imunológico dos animais, especificamente o tecido linfóide associado ao intestino (GALT). Estas bactérias também são fundamentais à tolerância aos antígenos de origem alimentar (MOREAU & CORTIER, 1998; COX *et al.*, 2002). A suplementação de leitões e porcas com *Enterococcus faecium* apresentou um efeito positivo sobre a colonização prévia e desafio por *E. coli* enteropatogênica (SCHAREK *et al.*, 2005). Este efeito também foi observado para *Salmonella* spp., empregando *Lactobacillus* spp. em suínos e aves (TSAI *et al.*, 2005, DE ANGELIS *et al.*, 2006).

A acidificação do trato digestório e urinário apresenta efeito bactericida sobre diversos patógenos. Além disto, estas mesmas condições de pH no intestino

permitem a proliferação de *Lactobacillus* spp., que bloqueiam possíveis receptores para colonização e proliferação de *E. coli* e produzem substâncias que afetam de modo negativo a maior parte das bactérias gram negativas (TSILOYIANNIS *et al.*, 2001). Os principais acidificantes utilizados na suinocultura brasileira são o cloreto de amônio e o ácido cítrico. Estes compostos atuam reduzindo temporariamente o pH da urina, bem como aumentando a ingestão de água pelas fêmeas, que estão diretamente relacionados com as reduções dos quadros infecciosos (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999). O uso de fitoterápicos em suínos também tem sido descrito, tendo apresentado efeitos benéficos, como a redução nos casos de colibacilose neonatal e diarreia pós-demasme, assim como a redução na resistência dos isolados de *E. coli* (DOCIC & BILKEI, 2003).

Em nosso estudo os principais fatores de patogenicidade detectados por PCR nos isolados de *E. coli* obtidos de casos clínicos foram a presença dos genes para STb (26), LT (23), F18 (17), F4 (12), STa (12), F5 (9), F41 (7) e STx (2), os quais podem ser observados em diversas combinações (Tabela 2). Esta heterogeneidade no perfil de fímbrias e toxinas ressalta a importância de vacinas autógena, ou que contenham na sua composição fímbrias e toxinas próprias da propriedade ou da região.

Tabela 2. Perfil de fímbrias e toxinas amplificadas por PCR nos isolados de *E. coli* provenientes de suínos com diarreia.

| Padrão | Número de Isolados |
|---------------|---------------------------|
| F4 | 1 |
| F5 | 3 |
| STa | 1 |
| STb | 1 |
| LT | 3 |

| | |
|----------------------------|---|
| F4, STa | 1 |
| F5, LT | 1 |
| F5, STa | 3 |
| F18, LT | 1 |
| F18 STx | 1 |
| F4, F18 | 1 |
| F41, STb | 3 |
| STb, LT | 6 |
| F4, LT, STb | 1 |
| F4, F18, LT | 3 |
| F4, STb, LT | 1 |
| F5, STa, STb | 1 |
| F18, LT, STb | 4 |
| F18, STa, STb | 1 |
| F41, LT, STb | 1 |
| F4, F18, STa, STb | 2 |
| F18, F41, STa, STb | 1 |
| F4, F18, LT, STb, STa | 1 |
| F18, F41, STa, STb, STx | 1 |
| F4, F18, F41, STa, STb, LT | 1 |

As vacinas são muito utilizadas para controle das infecções nos seres humanos e nos animais (TIZARD, 2000) e bacterinas contendo *E. coli* inativadas por formol são amplamente utilizada para prevenir a infecção nos leitões. *E. coli* enterotoxigênicas são caracterizadas pela presença de fímbrias e toxinas, as quais podem ser adquiridas pelos plasmídeos (CHU *et al.*, 2005). A colonização bacteriana é produzida por fímbrias e a determinação dos principais mecanismos de ação destes elementos é fundamental ao esclarecimento das interações entre as ETEC e seus hospedeiros (GUERRANT *et al.*, 1999). As fímbrias F4 e F18 são muito importantes na patogenia da enfermidades nos suínos. Enquanto a F4 e a F18 são associadas às ETEC, a F18 é associada também as VETEC (VERDONCK *et al.*, 2002). As fímbrias são filamentos proteínáceos, que são expressas na superfície da bactéria e interagem com receptores nas células do intestino do hospedeiro (VAN DER STEDE *et al.*, 2002). A resistência à infecção por *E. coli* é conferida pela ausência de receptores, a qual é determinada por um gene autossômico recessivo

nos leitões (VERDONCK *et al.*, 2002). Para a fímbria F4, a subunidade FaeG é descrita como a porção da adesina envolvida na aderência bacteriana (VERDONCK *et al.*, 2004). As fímbrias são interessantes para a construção de vacinas, pois além de se localizarem em alta quantidade na superfície da bactéria, estas possuem uma característica polimérica que é altamente imunogênica (VERDONCK *et al.*, 2005). Nossos dados concordam com os da literatura que sugere que as fímbrias do padrão STb and LT seriam encontradas com maior frequência em ETEC. Segundo RIISING *et al.* (2005) a incorporação de toxinas, especificamente a LT, em vacinas contendo misturas de fímbrias (F4, F5 e F6) purificadas melhorou os níveis de proteção em suínos desafiados.

A determinação do potencial de virulência dos isolados de *E. coli* é muito importante para a seleção de cepas vacinais, sendo um critério muito utilizado para determinação do potencial patogênico nos isolados de *E. coli* a presença de hemólise (BRITO *et al.*, 2004). Contudo isolados não hemolíticos também possuem potencial patogênico. SCHIERACK *et al.* (2006) ao estudarem o potencial enterotoxigênico de *E. coli* isoladas de suínos saudáveis verificaram a ausência de correlação entre a presença de hemólise e dos fatores de virulência. Em nosso estudo 51 (79%) isolados de *E. coli* entérica e 10 (12,5%) isolados de origem urinária foram hemolíticos ou apresentaram o gene da alfa hemolinisa (*hlyA*), o que sugere a maior associação entre hemólise e virulência nos isolados de origem intestinal ($p < 0,05$).

E. coli pode ser agrupada em quatro grupos filogenéticos principais: grupos A, B1, B2 e D. A maior parte dos isolados comensais pertencem ao grupo A, enquanto que as *E. coli* extra-intestinais aos grupos B2 e D (CLERMONT *et al.*, 2000). O grupo B2 é o que apresenta maior transferência via elementos genéticos móveis

(JOHNSON *et al.*, 2001; SKURNIK *et al.*, 2005). Em nosso estudo, vários isolados de *E. coli* foram negativos à pesquisa de fatores de virulência analisados por PCR, sendo 19 isolados de suínos com diarréias, 6 de suínos saudáveis, 9 de amostras obtidas de meio ambiente e 46 isolados de fêmeas com infecção urinária. Contudo, esses isolados foram obtidos de animais enfermos, portanto a caracterização do potencial real de patogenicidade dos isolados torna-se necessária em estudos futuros. Este auxiliará na escolha de futuras cepas vacinais.

Além de conter na sua composição fímbrias e toxinas próprias das cepas patogênicas de *E. coli*, uma vacina para colibacilose deve induzir mecanismos de proteção de mucosas. A imunidade de mucosas tem início pelo estímulo do tecido linfóide associado ao intestino, localizado na lâmina própria. O estímulo particularmente das placas de Peyer, leva a diferenciação de plasmócitos e produção de IgA (COX *et al.*, 2002; VERDONCK *et al.*, 2005). As vacinas contendo bactéria ou proteínas purificadas são utilizadas na vacinação de fêmeas prenhas, as quais transferiram os anticorpos produzidos aos leitões através do colostro (TIZARD, 2000). A IgA deve ser considerada o principal indicador de uma imunidade de mucosas apropriada (SARRAZIN & BERTSHINGER, 1997). Níveis protetores de IgA podem ser obtidos via imunização parenteral de porcas, contudo para tal são importantes a dose, número de aplicações e local da aplicação (VAN DER STEDE *et al.*, 2002). Esta forma de vacinação é eficaz na redução dos índices de colibacilose neonatal, principalmente em fêmeas primíparas provenientes de rebanhos sem problemas com a infecção por *E. coli* que comprovadamente possuem pouco o nenhum título de anticorpos contra os principais fatores de virulência deste patógeno (RIISING *et al.*, 2005).

Embora a vacinação das porcas, com conseguinte passagem de imunoglobulinas no colostro seja eficaz na profilaxia da colibacilose neonatal, na diarreia pós-desmame estes anticorpos são ineficientes. Esta falha na resposta imunológica se deve a diminuição na resposta passiva nos animais após o desmame, o que torna necessária uma estimulação no mecanismo de proteção de mucosas (VERDONCK *et al.*, 2002; LIANG *et al.*, 2006). Nos leitões, o uso de vacinação parenteral, além de produzir uma proteção parcial, requer um manejo diferenciado, que produz estresse e gera custos adicionais (LIANG *et al.*, 2006). Para produção de altos níveis de IgA, estratégias de vacinação oral são muito importantes, uma vez que a imunização parenteral não produz níveis adequados desta imunoglobulina no intestino (VERDONCK *et al.*, 2005). Antígenos solúveis administrados por via oral podem induzir a tolerância oral, contudo o uso de antígenos particulados ou replicantes induzem imunidade ativa (COX *et al.*, 2002; VERDONCK *et al.*, 2005). A dose do antígeno também é muito importante no sentido do padrão de resposta imunológica obtida. O uso de altas doses de proteína solúvel estimulam uma diferenciação de Th-1, o qual está relacionado a resposta celular, enquanto que baixas doses induzem a diferenciação de Th-2, que estimula a multiplicação de plasmócitos produtores de IgA (VAN DER STEDE *et al.*, 2002). No desenvolvimento de vacinas orais para os suínos deve-se ter em conta que a ação enzimática ao longo da passagem da vacina pelo trato digestório induz significativas variações antigênicas (SNOECK *et al.*, 2004). Os mesmos autores comprovaram que a imunização oral induz uma menor proteção, quando comparada a imunização direta no lúmen do intestino delgado. Este problema tem sido resolvido pela vacinação dos leitões por *pellets*, que liberam os antígenos somente no jejuno (SNOECK *et al.* 2004).

Outras estratégias de vacinação também têm sido estudadas para melhoria nos níveis de proteção dos leitões tanto nas primeiras horas de vida, como no período pós-desmame. Estes envolvem estratégia de vacinação oral, contendo antígenos fimbriais recombinantes administrados oralmente e protegidos da degradação no trato digestório (COX *et al.*, 2002; VERDONCK *et al.*, 2002; VERDONCK *et al.*, 2005). LIANG *et al.* (2006) demonstrou que antígenos de F4 produzidos em plantas transgênicas apresentaram boas propriedades imunológicas, quando administradas oralmente. Tendo como objetivo melhorar o desafio oral de antígenos de *E. coli* administrados por via oral adesinas de F5 foram expressas em *Lactobacillus acidophilus* dando origem a uma probiovacina (CHU *et al.*, 2005). Vacinas de DNA também têm sido estudadas empregando, por exemplo, o gene *faeC* da fímbria F4 (SIMIONATTO *et al.*, 2005).

Dada a importância da infecção por *E. coli* no rebanho suíno brasileiro, os esforços técnicos no sentido de controle e profilaxia da enfermidade e o amplo uso de antimicrobianos para prevenção da enfermidade o presente estudo chega as seguintes conclusões:

- ETEC foram detectadas tanto em isolados entéricos (42 isolados), como em urinários(13 isolados);
- STEC foi identificada em dois isolados entéricos;
- UPEC foram detectados em 12 dos isolados de *E. coli* obtidos de fêmeas com infecção urinária, sendo que em nove isolados foram detectados fatores de virulência de ETEC e UPEC simultaneamente;
- A maior parte dos isolados de *E. coli* foram resistentes a mais de três antimicrobianos testados, independente de sua fonte de isolamento;

- A resistência múltipla aos antimicrobianos foi verificada tanto em isolados de *E. coli* de origem urinária (95,12%), como entérica e ambiental (63,75%);
- Plasmídeos foram encontrados na maioria dos isolados *E. coli* obtidos de suínos diarréicos (55/64-85,93%), das fezes de suínos saudáveis (6/7-85,71%) e do ambiente de criação (9/9-100%), sendo estes detectados com menor frequência nos isolados de origem urinária (32/82-40%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>>. Acesso em 13 de setembro de 2006.

AMEZCUA, R.; FRIENDSHIP, R.M.; DEWEY, C.E.; GYLES, C. & FAIRBROTHER, J.M. Presentation of postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66:73-78, 2002.

AN, H.; FAIRBROTHER, J.M.; DESALTEUS, C.; MABROUK, T.; DUGOURD, D.; DEZFULIAN, H. & HAREL, J. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB*

and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. *Microbial Pathogenesis* 28(5):291-300, 2000.

BARCELLOS, D. & SOBESTIANSKY, J. Uso de antimicrobianos em suinocultura. 1 ed. Goiânia: Sobestiansky. 1998, 103p.

BEIER, R.C.; BISCHOFF, K.M.; ZIPRIN, R.L.; POLLE, T.L. & NISBET, T.J. Chlorhexidine susceptibility, virulence factors, and antibiotic resistance of beta-hemolytic *Escherichia coli* isolated from neonatal swine with diarrhea. *Bulletin of Environment Contamination Toxicology*, 75:835-844, 2005.

BERTSCHINGER, H.U. & FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli* infections. In: STRAW, B.E. *Diseases of swine*. Iowa : Iowa State University Press, 1999. Cap.32, p.431-468.

BRITO, B.G.; LEITE, D.S.; LINHARES, R.E. & VIDOTTO, M.C. Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. *Veterinary Microbiology*, 65(2):123-132, 1999.

BRITO, B.G.; VIDOTTO, M.C.; BERBEL, M.M. & TAGLIARI, K.C. Fatores de virulência presentes em amostras de *E. coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. *Ciência Rural*, 34(2):645-652, 2004.

BURROWS, N.R. & RANKIN, J.D. A further examination of the survival of pathogenic bacteria in cattle slurry. *Brazilian Veterinary Journal*, 116(8): 1970.

CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environment Microbiology*, 8(7):1137-1144, 2006.

CHOI, B.K. & SCHIFFERLI, D.M. Characterization of FasG segments required for 987P fimbria-mediated binding to piglets glycoprotein receptors. *Infection and Immunity*, 69(11):6625-6632, 2001.

CHU, H.; KANG, S.; HA, S.; CHO, K.; PARK, S.M.; HAN, K.H.; KANG, S.K.; LEE, H.; HAN, S.H.; YUN, C.H. & CHOI, Y. *Lactobacillus acidophilus* expressing recombinant K99 adhesive fimbriae has an inhibitory effect on adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiology and Immunology*, 49(11):941-8, 2005.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S. & BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied Environment Microbiology*, 66(10):4555-8, 2000.

COX, E.; STEDE, Y.V.; VERDONCK, F.; SNOECK, V.; BROECK, W.V. & GODDERIS, B. Oral immunization of pigs with fimbrial antigens of enterotoxigenic *E. coli*: an interesting model to study mucosal immune mechanisms. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 87:287-290, 2002.

DALLA COSTA, O.A.; DIESEL, R.; LOPES, E.J.C.; HOLDEFER, C. & COLOMBO, S. Sistema Intensivo de Suínos Criados ao Ar Livre - SISCAL: Dimensionamento de um sistema. EMBRAPA CNPSA, circular técnica 289, 2001, 5pp.

DE ANGELIS, M.; SIRAGUSA, S.; BERLOCO, M.; CAPUTO, L.; SETTANNI, L.; ALFONSI, G.; AMERIO, M.; GRANDI, A.; RAGNI, A. & GOBBETTI, M. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Research Microbiology*, 157(8):792-801, 2006.

DOCIC, M. & BILKEI, G. Differences in antibiotic resistance in *Escherichia coli*, isolated from East-European swine herds with or without prophylactic use of antibiotics. *Journal of Veterinary Medical Infectious Diseases and Veterinary Public Health B*, 50:27-30, 2003.

DOUGAN, G.; HAQUE, A.; PICKARD, D.; FRANKEL, G.; O'GOARA, P. & WAIN, J. The *Escherichia coli* gene pool. *Current Opinion in Microbiology*, 4(1):90-94, 2001.

DUNLOP, R.H.; McEWEP, S.A.; MEEK, A.H.; CLARCKE, R.C.; BLACK, W.D. & FRIENDSHIP, R.M. Associations among antimicrobial drug treatments and antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* of swine on 34 farrow-to-finish farms in Ontario, Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 34:283-305, 1998.

GUERRANT, R.L.; STEINER, T.S.; LIMA, A.A. & BOBAK, D.A. How intestinal bacteria cause disease. *Journal of Infection Disease*, 179(2): 5331-5337, 1999.

GYLES, C.L. & FAIRBROTHER, J.M. In: GYLES, C.L. *et al. Escherichia coli* In: *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Ames, Iowa : Iowa State University Press, 2004. p.193-214.

HART, W.S.; HEUZENROEDER, M.W. & BARTON, M.D. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and enterococci associated with pigs in Australia. *Journal of Veterinary Medical Infectious Diseases and Veterinary Public Health B*, 51:216-221, 2004

HATHA, M.; VIVEKANANDHAN, A.A.; JOICE, G. & CHRISTOL, M. Antibiotic resistance pattern of motile Aeromonads from farm raised fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology*, 98(2):131-134, 2005.

HAGMAN, R. & GREKO, C. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from bitches with piometra and from urine samples from other dogs. *Veterinary Record*, 157(7):193-196, 2005.

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

JOHNSON, J.R.; DELAVARI, P.; KUSKOWSKI, M. & STELL, A.L. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 183:78-88, 2001.

KAU, A.L.; HUNSTAD, D.A. & HULTGREN, S.J. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. *Current Opinion in Microbiology*, 8(1):54-59, 2005.

KEN, C. & BILKEI, G. Effects of vaccination and of a phytogetic feed additive on postweaning mortality due to *Escherichia coli* and on piglet performance. *Veterinary Record*,153(10):302-303, 2003.

LIANG, W.; HUANG, Y.; YANG, X.; ZHOU, Z.; PAN, A.; QIAN, B.; HUANG, C.; CHEN, J. & ZHANG, D. Oral immunization of mice with plant-derived fimbrial adhesion FaeG induces systemic and mucosal K88ad enterotoxigenic *Escherichia coli*-specific immune responses. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 46:393-399, 2006.

MOREAU, M.C.& CORTIER, G. Effect of the gastrointestinal microflora on induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in C3H/HeJ mice. *Infection and Immonology*, 56:2766-2768, 1998.

MORO, M.H.; BERAN, G.W.; GRIFFITH, R.W. & HOFFMAN, L.J. Effects of heat stress on the antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* of the intestinal flora of swine. *Journal of Applied Microbiology*, 88:836-844, 2000.

MOXLEY, R.A. Edema disease. *Veterinary Clinicals North America: Food Animal Practice*,16(1):175-185, 2000.

PARVEEN, S.; LUKASIK, J.; SCOTT, T.M.; TAMPLIN, M.L.; PORTIER, K.M.; SHEPERD, S.; BRAUN, K. & FARRAH, S.R. Geographical variation in antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from swine, poultry, beef and dairy cattle farm water retention ponds in Florida. *Journal of Applied Microbiology*, 100:50-57, 2006.

PATERSON, D.L. Resistance in gram negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Infection Control*, 34(5):520-528, 2006.

PORK WORLD. Disponível em: <<http://www.porkworld.com.br>>. Acesso em 13 de setembro de 2006.

PORTO, R.N.G.; SOBESTIANSKY, J.; MATOS, M.P.C & GAMBARINI, M.C. Aspectos físicos químicos e microbiológicos da urina de matrizes suínas descartadas. *Ciência Rural*, 33(2):319-324, 2003.

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

RIISING, H.J.; MURMANS, M. & WITVLIET, M. Protection against neonatal *Escherichia coli* diarrhoea in pigs by vaccination of sows with a new vaccine that contains purified enterotoxic *E. coli* virulence factors F4ac, F4ab, F5 and F6 fimbrial antigens and heat-labile *E. coli* enterotoxin (LT) toxoid. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases Veterinary Public Health*, 52(6):296-300, 2005.

RIJAVEK, M.; ERJAVEC, M.S.; AVGUSTIN, J.A.; REISSBRODT, R.; FUTH, A.; KRIZAN-HERGOUTH, V. & ZGUR-BERTK, D. High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Current Microbiology*, 53:158-162, 2006.

SANTOS, J.R.G. & GIL-TURNES, C. Probióticos em avicultura. *Ciência Rural*, 35 (3):741-747, 2005.

SARIDAKIS, H.O.; GARED, S.A.; VIDOTTO, M.C. & GUTH, B.E. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 54(2):145-153, 1997.

SARRAZIN, E. & BERTSCHINGER, H.U. Role of fimbriae F18 for actively acquired immunity against porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 54:133-144, 1997.

SCHIERACK, P.; STEINRUCK, H. & KLETA, S. Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. *Applied Environmental Microbiology*, 72:6680-6686, 2006.

SCHMIDT, A.S.; BRUUN, M.S.; DALSGAARD, I.; PEDERSEN, K. & LARSEN, J.L. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11):4908-4915, 2000.

SCHREMBI, M.A.; KJAERGGARD, K. & KLEMM, P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology*, 48(1):253-67, 2003.

SHAREK, L.; GUTH, J.; REITER, K.; WEIRAUCH, K.D.; TARAS, D.; SCHWERK, P.; SHIERACK, P.; SCHMIDT, M.F.G.; WIELER, L.H. & TEDIN, K. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 105:151-161, 2005.

SHERLEY, M.; GORDON, D.M. & COLLIGNON, P.J. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 150(5):1539-1546, 2004.

SILVEIRA, W.D.; BENETTI, F.; LANCELOTTI, M.; FERREIRA, A.; SOLFERINI, V.N. & BROCHI, M. Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 43(6):303-310, 2001.

SIMIONATO, S.; VAZ, E.K.; MICHELON, A.; SEIXAS, F.K. & DELLAGOSTIN, O.A. Desenvolvimento e avaliação de novas estratégias de imunização contra colibacilose suína. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 25(2):84-90, 2005.

SKURNIK, D.; MENACH, A.L.; ZURAKOWSKI, D.; MAZEL, D.; COURVALIN, P.; DENAMUR, E.; ANDREMONT, A. & RUIIMY, R. Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7):3062-3065, 2005.

SNOECK, V.; COX, E.; VERDONKC, F.; JOENSU, J.J. & GODDEERIS, B.M. Influence of porcine intestinal pH and gastric digestion on antigenicity of F4 fimbriae for oral immunization. *Veterinary Microbiology*, 98:43-53, 2004.

SOBESTIANSKY, J., MORES, N., VIEIRA, R.P., SOBESTIANSKY, A.A.B., VIEIRA, H.P., LIEBHOLD, M., WENDT, M. *Infecções urinárias na fêmea suína*. Concórdia, SC: EMBRAPA-CNPSC, 1991. 49p. (Circular Técnica 11).

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N.; CARVALHO, L.F. & OLIVEIRA, S. *Clínica e patologia suína*. 2 ed., Goiânia: J. Sobestiansky, 1999, 464pp.

SOTO, S.M.; SMITHSON, A.; HORKAJADA, J.P.; MARTINEZ, J.A.; MENSA, J.P. & VILA, J. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(10):1021-1045, 2006.

STROHL, W.A.; ROSE, H. & FISHER, B.D. Bacilos Entéricos Gram-Negativos in: *Microbiologia Ilustrada*. 1 ed. Porto Alegre: Art Méd, 2004, p. 189-204.

TENG, L.J.; HSUEH, P.R.; LIAW, S.J.; HO, S.W. & TASAI, J.C. Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. *Journal of Microbiology Immunology Infection*, 37(6):327-334, 2004.

TIZARD, IR Veterinary immunology. 7 ed. Philadelphia: Sauders, 2000, 493pp.

TOTH, I.; SCHMIDT, H.; DOW, M.; MALIK, A.; OSWALD, E. & NAGV, B. Transduction of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a Shiga toxin 2-encoding bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12):7242-7247, 2003.

TSAI, C.C.; HSIH, H.Y.; CHIU, H.H.; LAI, Y.Y.; LIU, J.H.; YU, B. & TSEN, H.Y. Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2):185-194, 2005.

TSILOYANNIS, V.K.; KYRIAKIS, S.C.; VLEMMAS, J. & SARRIS, K. The effect of organic acids on the control of post-weaning oedema disease of piglets. *Research Veterinary Science*, 70(3):281-5, 2001.

VAN DER STEDE, Y.; COX, E. & GODDEERIS, B.M. Antigen dose modulates the immunoglobulin isotype responses of pigs against intramuscularly administered F4-fimbriae. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 25(3-4):209-16, 2002.

VERDONCK, F.; COX, E.; VAN GOG, K.; VAN DER STEDE, Y.; DUCHATEAU, L., DEPRez, P. & GODDEERIS, B.M. Different kinetic of antibody responses following infection of newly weaned pigs with an F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* strain or an F18 verotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Vaccine*. 26(23-24):2995-3004, 2002.

VERDONCK, F.; COX, E.; VAN DER STEDE, Y. & GODDEERIS, B.M. Oral immunization of piglets with recombinant F4 fimbrial adhesion FaeG monomers induces a mucosal and systemic F4-specific immune response. *Vaccine*, 22: 4291-4299, 2004.

VERDONCK, F.; De HAUWERE, V.; BOUCKAERT, J.; GODDEERIS, B.M. & COX, E. Fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* function as a mucosal carrier for a coupled heterologous antigen. *Journal of Control Release*, 18(2):243-58, 2005 .

WALLMANN, J. Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. *International Journal of Medical Microbiology*, 41:81-86, 2006.

WHITE, D.G.; FEDOKA-CRAY, P. & CHILLER, T.C. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). *NMC Annual Meeting Proceedings*, 56-60, 2006.

ZHANEL, G.G.; HIRANAGA, T.L.; LAING, N.M.; DeCORBY, M.R.; NICHOL, K.A.; WESHNOVESKI, B.; JOHNSON, J.; NOREDDIN, A.; LOW, D.E.; KARLOWSKY, J.A.

& HOBAN, D.J. Antibiotic resistance in Escherichia coli outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(6):468-75, 2006.

CURRICULUM VITAE

Maio/2007

DADOS PESSOAIS

Nome: Mateus Matiuzzi da Costa
Nome em citações bibliográficas: COSTA, M. M.
Sexo: Masculino

Filiação: Olmiro Beltrame da Costa e
Olinda Matiuzzi da Costa

Nascimento: 05/04/1976 - Santa Maria/RS - Brasil
Carteira de Identidade: 6049494948 SSP - RS - 07/08/1992
CPF: 803.979.560-53

Endereço residencial: Rua Jatobá, 51
Bairro Jatobá - Petrolina
56332-210, PE - Brasil
Telefone: (87) 3861.8571

Endereço profissional: Universidade Federal do Vale do São Francisco
Colegiado de Zootecnia, Campus da FEX
Rua da Simpatia, 179
Centro - Petrolina
56304-440, PE - Brasil
Telefone: (87) 3986.3800 Fax: (87) 3986.3804

URL da home page: <http://www.univasf.edu.br>

Endereço eletrônico: e-mail para contato: mateus.costa@univasf.edu.br
e-mail alternativo: mmatiuzzi@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2001 - 2002 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Aplicação do gene apxIVA para o diagnóstico da pleuropneumonia suína
Ano de obtenção: 2003
Orientadora: Irene Silveira Schrank
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Palavras-chave: pleuropneumonia, gene apxIVA, 16SrDNA, suínos
Áreas do conhecimento: Microbiologia Aplicada, Doenças Infecciosas de Animais
Setores de atividade: Produção animal, inclusive serviços veterinários

1995 - 2000 Graduação em Medicina Veterinária.
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

1 Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF

Vínculo institucional

2006 - Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Professor Microbiologia e Imunologia, Regime: Dedicção Exclusiva

Atividades

08/2006 - Atual **Projetos de pesquisa**, Colegiado de Zootecnia
Participação em projetos:

1. Diagnóstico e caracterização dos agentes etiológicos da mastite em ovinos e caprinos no Município de Petrolina e região
2. Efeito de extratos fitoterápicos sobre agentes bacterianos

08/2006 - Atual **Graduação**, Zootecnia
Disciplinas Ministradas:

1. Doenças Infecto Contagiosas
2. Imunologia
3. Microbiologia

2 Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

Vínculo institucional

2004 - 2004 Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Professor de Microbiologia, Carga horária: 18, Regime: Parcial

Atividades

03/2004 - 12/2004 **Projetos de pesquisa**, Curso de Medicina Veterinária
Participação em projetos:

1. Efeito do probiótico sacharomyces cerevisiae sobre a flora intestinal de tilápia do nilo.

03/2004 - 12/2004 **Graduação**, Medicina Veterinária
Disciplinas Ministradas:

1. Microbiologia

3 Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC

Vínculo institucional

2003 - 2006 Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Professor de Microbiologia e Medicina Veterinária Preventiva, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

2003 - 06/2006 **Projetos de pesquisa**, Curso de Medicina Veterinária

Participação em projetos:

1. Flora microbiana das carpas (*C. carpio*)
2. Agentes etiológicos da mastite ovina
3. Agentes etiológicos da mastite bovina no Município de Xanxerê e região
4. Avaliação de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina no Município de Xanxerê e região
5. Caracterização microbiológica da água do Rio Ditinho
6. Determinação do conteúdo de plasmídeos em isolados clínicos e ambientais de *E. coli*

2003 - 06/2006 **Graduação**, Medicina Veterinária, Engenharia Florestal e Zootecnia

Disciplinas Ministradas:

1. Biologia Celular e Molecular
2. Administração e Planejamento em Saúde Pública
3. Epidemiologia e Saúde Pública
4. Doenças Infecto Contagiosas
5. Imunologia
6. Microbiologia

4 Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Vínculo institucional

1995 - Vínculo: colaborador, Enquadramento funcional: Colaborador em projetos de pesquisa, Regime: Parcial

Atividades

2000 - Atual **Projetos de pesquisa**, DMVP

Participação em projetos:

1. Caracterização isolados classificados bioquimicamente como *Rhodococcus equi* e obtidos de búfalos e javalis
2. PCR multiplex para caracterização da família dos genes vap em *R. equi*
3. Padronização e validação de métodos para a detecção de organismos geneticamente modificados (OGMs) em alimentos
4. Laboratório de expressão de proteínas e antígenos na Região Central do Estado
5. Reação em cadeia da polimerase múltipla para caracterização de isolados clínicos e ambientais de *R. equi* do Brasil
6. Caracterização antigênica de proteínas de superfície (S-Layer) de *Campylobacter fetus* isoladas de bovinos
7. Caracterização molecular e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* obtidas em criatórios suínos da Região Sul do Brasil
8. Caracterização Molecular de Isolados de *Streptococcus equi*
9. Clonagem e expressão do gene vapA de *R. equi*
10. Clonagem e expressão do gene da proteína de superfície (SAP)
11. Padronização da técnica de PCR para diagnóstico da campilobacteriose genital bovina

2000 - Atual **Pesquisa e Desenvolvimento**, DMVP

Linhas de Pesquisa:

1. patogenicidade de patógenos de interesse veterinário

5 Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2003 - Vínculo: Doutorando, Enquadramento funcional: Aluno do PPGBCM, Carga horária: 20, Regime: Parcial
2001 - 2002 Vínculo: Mestrado, Enquadramento funcional: Aluno do PPGBCM, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

03/2001 - Atual **Projetos de pesquisa**, Centro de Biotecnologia
Participação em projetos:

1. Genes envolvidos na patogenicidade de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

LINHAS DE PESQUISA

1 Patogenicidade de patógenos de interesse veterinário

PROJETOS

Efeito de extratos fitoterápicos sobre agentes bacterianos

Situação: Desativado; Natureza: Outra

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa (Responsável); Patrícia Alves Batista; Maria da Conceição Aquino de Sá; Carla Samantha Rodrigues Silva

2006 - Atual Diagnóstico e caracterização dos agentes etiológicos da mastite em ovinos e caprinos no Município de Petrolina e região

Descrição: A produção de ovinos e caprinos é uma atividade econômica de importância ao Município de Petrolina e região. A mastite em ovinos e caprinos está associada a sérios prejuízos nos criatórios ovinos, sejam de aptidão leiteira ou de corte. A mastite nestes animais está associada a redução brusca na produção de leite, a qual pode ocasionar a morte dos cordeiros. Para o diagnóstico da mastite, vários testes podem ser conduzidos, como o teste de CMT (realizado a campo) e WS e isolamento e cultivo, realizados no laboratório. O presente estudo tem por objetivo a caracterização dos principais agentes bacterianos envolvidos com a mastite em ovinos e caprinos, bem como determinar a sua sensibilidade aos antimicrobianos. Para tanto, leite será colhido em diversas propriedades do Município de Petrolina e região. As amostras serão remetidas ao laboratório, onde serão realizados os testes de WS para determinar o grau de inflamação da glândula mamária, bem como o isolamento bacteriano. Após a identificação por testes bioquímicos, as bactérias serão submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos Kirb Bauer modificado.

Situação: Em Andamento; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (3);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa (Responsável); Patrícia Alves Batista; Maria da Conceição Aquino de Sá; Carla Samantha Rodrigues Silva

2005 - Atual PCR multiplex para caracterização da família dos genes vap em R. equi

Descrição: As vap (virulence associated proteins) são marcadores da virulência de R. equi para os potros. Recentemente, vários genes codificando uma família gência para as proteínas Vap foram encontradas. Entretanto, o papel na patogenese da infecção, bem como a distribuição destes genes nos isolados de R. equi ainda não são claros. O presente estudo tem por objetivo caracterizar a presença dos genes da família vap através da técnica de PCR multiplex. Para tal, isolados clínicos e ambientais de R. equi obtidos de diferentes origens, como eqüinos e seu ambiente, bovinos, aves, suídeos, bulbalinos e seres humanos serão analisados. Com este estudo pretende-se auxiliar na compreensão da participação das proteínas vap nas enfermidades ocasionadas por R. equi.

Situação: Em Andamento; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa; Agueda Castagna Vargas (Responsável); Cristina Costa Krewer; Guilherme Drescher

2005 - 2006 Agentes etiológicos da mastite ovina

Descrição: A mastite em ovinos está associada a sérios prejuízos nos criatórios ovinos, sejam de aptidão leiteira ou de corte. A mastite nestes animais está associada a redução brusca na produção de leite, a qual pode ocasionar a morte dos cordeiros. Para o diagnóstico da mastite, vários testes podem ser conduzidos, como o teste de CMT (realizado a campo) e WS e isolamento e cultivo, realizados no laboratório. O presente estudo tem por objetivo a caracterização dos principais agentes bacterianos envolvidos com a mastite em ovinos, bem como determinar a sua sensibilidade aos antimicrobianos. Para tanto, leite será colhido em diversas propriedades do estado de SC e RS. As amostras serão remetidas ao laboratório, onde serão realizados os testes de WS para determinar o grau de inflamação da glândula mamária, bem como o isolamento bacteriano. Após a identificação por testes bioquímicos, as bactérias serão submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos Kirb Bauer modificado.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa (Responsável); Guilherme Drescher; Samara Paula Mattiello; Marlon Nadal Maciel

2004 - 2006 Caracterização microbiológica da água do Rio Ditinho

Descrição: A água é um dos principais alimentos para os seres humanos e para os animais. A criação de suínos é responsável por graves impactos ambientais, especialmente quando os dejetos não são

tratados de forma adequada. O presente estudo tem por objetivo caracterizar a qualidade microbiológica da água do Rio Ditinho em SC, bem como verificar a ocorrência de resistência aos antimicrobianos em bactérias isoladas da água e do sedimento do rio. Para tal, amostras de água serão colhidas e o número de coliformes totais e fecais determinado pela técnica do NMP. Bactérias serão isoladas da água e do sedimento do rio, sendo, após, identificadas e submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos Kirb Bauer modificado.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa (Responsável); Lilian Kolling; Gabriela Salami; Vlademir Martarello; Gracielli Barbieri

2004 - Atual Avaliação de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina no Município de Xanxerê e região

Descrição: A leucose enzoótica bovina (LEB) é provocada por um retrovírus, sendo associada a inúmeras perdas nos rebanhos bovinos leiteiros do mundo. As perdas decorrem tanto do desenvolvimento de tumorações nos animais, como pela imudepressão associada com infecções secundárias. As últimas ocasionam os principais prejuízos ligados a enfermidade e muitas vezes não são percebidas pelo produtor. Nos Estados do PR e RS, vários estudos foram conduzidos no intuito de determinar a prevalência de LEB. Contudo, no Estado de SC estes não foram conduzidos. O objetivo do presente estudo é determinar a prevalência de anticorpos contra a leucose enzoótica bovina em propriedades do Município de Xanxerê, SC. Para tal, soro de bovinos leiteiros serão colhidos e submetidos ao teste de imunodifusão em gel de agar (IDGA).

Situação: Em Andamento; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa (Responsável); Cristina Costa Krewer; Guilherme Drescher; Samara Paula Mattiello

2004 - 2005 Efeito do probiótico *sacharomyces cerevisiae* sobre a flora intestinal de tilápia do nilo

Descrição: A tilápia do nilo (*O. niloticus*) é uma das espécies de peixe de maior cultivo no mundo. No Brasil, a região oeste do Paraná possui uma grande importância à piscicultura brasileira. Tendo em vista a melhoria da produtividade, os peixes passaram a ser criados de forma intensiva, o que favorece o estresse. Neste momento, os animais se tornam susceptíveis à infecções, especialmente as bacterianas. O *S. cerevisiae* vem sendo amplamente utilizado como probiótico para reduzir estas infecções em diversas espécies animais. Nos peixes, ainda são poucos os estudos a respeito das interações destes microrganismo com a microbiota normal e patogênica. Em nosso estudo, caracterizaremos esta interação, bem como determinaremos a microbiota de tilápias. Para tanto, amostras do intestino delgado de alevinos alimentados com *S. cerevisiae* como probiótico serão pesados e submetidos a contagem de bactérias totais, de coliformes totais e de *S. cerevisiae*.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (3);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa (Responsável); Marlise Terezinha Mauwerk; Milton César Moura; Fabio Meurer; A. Freccia; A.F. Doblinski

2004 - Atual Padronização e validação de métodos para a detecção de organismos geneticamente modificados (OGMs) em alimentos

Descrição: O mercado da soja é o setor mais importante da pauta de exportações do agronegócio brasileiro. Atualmente, a comercialização de sementes transgênicas concentra-se, essencialmente, em três culturas: soja, milho e algodão. Nos dias atuais, o cultivo e o comércio de organismos geneticamente modificados (OGM's) vêm assumindo um importante papel econômico e social e está em franca ascensão. Com isso, existe a polêmica da liberação ou não desses para o consumo humano e/ou animal. Muitas empresas estão preocupadas em informar aos consumidores que seus produtos não contêm transgênicos, já que estes ainda não são bem aceitos por uma grande parcela da sociedade. Ressalta-se a importância da existência de instituições capazes de detectar a presença de OGMs e quantificá-los nos alimentos de consumo. Prevendo esta demanda, o LABAC (Laboratório de Bacteriologia do CCR/UFSM), junto ao Grupo de Soluções Tecnológicas, está desenvolvendo metodologias para determinar a presença e quantificar os resíduos de transgênicos em amostras de DNA extraídas de grãos e de produtos derivados, com base na técnica de amplificação de fragmentos de DNA denominada reação em cadeia da polimerase (PCR, de polymerase chain reaction). Para a detecção de amostras transgênicas, será utilizado a Região promotora 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). Serão testados diferentes protocolos para a preparação e o isolamento do DNA das amostras a serem avaliadas, com posterior análise do conteúdo de OGM's nas amostras e padronização da técnica de PCR em tempo real (Real-time PCR).

Situação: Em Andamento; Natureza: Extensão

Alunos envolvidos: Graduação (2);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa; Cristina Costa Krewer; Agueda Castagna de Vargas (Responsável)

2004 - Atual Caracterização isolados classificados bioquimicamente como R. equi e obtidos de búfalos e javalis

Descrição: O R. equi é um cocobacilo gram positivo responsável por infecções no ser humano e nos animais. Bactérias classificadas através de testes bioquímicos padrão para R. equi foram obtidas de casos de mastite e pneumonia em búfalos e javalis. Estes isolados serão submetidos a testes moleculares confirmatórios, como PCR para amplificação de rDNA 16S e sequenciamento de DNA utilizando primers universais. Este estudo propiciará um melhor entendimento da patogenicidade de R. equi nestes animais, bem como a discussão de métodos alternativos e de maior precisão para identificação desta espécie.

Situação: Em Andamento; Natureza: Pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (3); Mestrado acadêmico (1);
Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa; Cristina Costa Krewer; Agueda Castagna de Vargas (Responsável); Lilian Kolling; Guilherme Drescher
Número de produções C,T & A: 1/

2004 - Atual Flora microbiana das carpas (*C. carpio*)
Descrição: As carpas (*C. carpio*) são peixes de importância econômica à piscicultura mundial. As bactérias são importantes agentes patogênicos nos peixes e estão associadas a diversos prejuízos pelo gasto com técnicos e medicamentos, redução na produtividade e mortalidade dos animais. O presente estudo objetiva determinar a flora microbiana com potencial patogênico em *C. carpio*, bem como determinar a sua sensibilidade aos antimicrobianos. No estudo, amostras foram colhidas de diferentes órgãos nos animais, pele, intestino, estômago, brânquias e rins. Estas foram, então, semeadas em AS e submetidas a identificação por testes bioquímicos e tintoriais. Em seguida, o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi determinado pelo teste de Kirb Bauer modificado.
Situação: Em Andamento; Natureza: Pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (3);
Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa (Responsável); Lilian Kolling; Guilherme Drescher; Andréia Inês Ferronato

2004 - Atual Laboratório de expressão de proteínas e antígenos na Região Central do Estado do RS
Descrição: O sequenciamento de ácidos nucleicos tornou-se hoje uma ferramenta fundamental em muitas áreas, sendo utilizado na pesquisa básica e nas pesquisas aplicadas a inúmeros problemas das áreas da saúde, da agricultura e meio ambiente. Tendo em vista o rápido progresso obtido no campo da genômica, e pelo crescente emprego de métodos moleculares de diagnóstico, baseados em PCR, hibridização de ácidos nucleicos e análise de regiões específicas de rDNA, espera-se um crescimento para as aplicações do sequenciamento de DNA. Atualmente, a expressão de proteínas recombinantes vem sendo uma técnica amplamente utilizada para a obtenção de antígenos para vacinas e testes de diagnósticos, bem como para produção de medicamentos e estudos de caracterização molecular de proteínas de interesse. No estado do RS, poucos são os centros de pesquisa onde esta tecnologia vem sendo utilizada. Na Universidade Federal de Santa Maria existe a carência de um laboratório especializado na expressão de proteínas recombinantes. Neste sentido, o laboratório de bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFSM vem desenvolvendo projetos de pesquisa nesta área. Consideramos que o fato de a UFSM ter sido escolhida para sediar um dos laboratórios de sequenciamento da Rede Sul de Análises de Genomas e Biologia Estrutural reflete a importância regional da instituição e o potencial da mesma. Deste modo, a implantação de um laboratório de expressão de proteínas e antígenos subsidiado permitirá a realização de trabalhos em diferentes linhas de pesquisa.

Situação: Em Andamento; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa; Cristina Costa Krewer; Agueda Castagna de Vargas (Responsável)

2003 - Atual Caracterização molecular e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* obtidas em criatórios suínos da Região Sul do Brasil

Descrição: Entre as enfermidades entéricas a de maior relevância à produção suinícola de nosso país, podemos citar a colibacilose. Essa enfermidade distribuição mundial e possui difícil controle, mesmo com os esforços realizados pela comunidade técnico- científica. Está associada a infecção por diferentes patótipos de *Escherichia coli* no trato intestinal, podendo levar a diferentes síndromes: (em especial) diarreias neonatais e pós desmame, bem como pela doença do edema. Além disto, a *E. coli* pode atuar associada a outros agentes infecciosos, ocasionando sérios prejuízos, quer seja, pela mortalidade dos animais, redução no ganho de peso e aumento dos custos com medicamentos e serviços veterinários. Logo, tornam-se importantes estudos envolvendo a determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados clínicos e ambientais de *E. coli*, bem como a capacidade de transmissão da resistência múltipla a outros isolados. Além disso, a caracterização dos principais patótipos de *E. coli* encontrados nas granjas e sua relação genética é fundamental para compreensão da epidemiologia da enfermidade e obtenção de dados de interesse para à produção e desenvolvimento de vacinas com maior eficiência para a profilaxia da enfermidade. O presente trabalho tem por objetivo realizar o isolamento, identificação, determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e capacidade de transmissão da resistência múltipla a outros isolados. Da mesma forma, a caracterização dos principais patótipos de *E. coli* encontrados nas granjas produtoras de suínos nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina e a relação genética entre isolados clínicos e ambientais de *E. coli*. Produzindo assim, subsídios para adoção de uma antibioticoterapia racional, compreensão da epidemiologia da enfermidade e produção de vacinas com maior eficiência..

Situação: Em Andamento; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (3); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa; Mariana Sá e Silva; Agueda Castagna de Vargas (Responsável); Irene Schrank; Shana Weber; Lilian Kolling; Guilherme Drescher; Franciele Maboni

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2003 - Atual Caracterização antigênica de proteínas de superfície (S-Layer) de *Campylobacter fetus* isoladas de bovinos

Descrição: As bactérias da espécie *Campylobacter fetus* são responsáveis por perdas econômicas tanto na pecuária leiteira como na de corte por causar a Campilobacteriose genital Bovina (CGB), uma

doença reprodutiva que tem como característica principal a repetição de cios, o aumento no intervalo entre partos e abortos esporádicos, Esta bactéria tem a capacidade de sofrer em ambientes hostis, rearranjos genômicos, os quais modificam epitopos reconhecidos por anticorpos do hospedeiro, burlando o sistema imune e fazendo com que a infecção torne-se persistente em alguns animais. Deste modo, o conhecimento das proteínas se superfície (S-layer) imunogênicas tem grande importância para a produção de vacinas que possam proteger de maneira eficaz os animais da infecção por *Campylobacter fetus*. Este trabalho tem por objetivo caracterizar antigenicamente as proteínas de superfície que tenham capacidade imunogênica, testadas com anticorpos monoclonais produzidos em coelhos.

Situação: Em Andamento; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa; Cristina Costa Krewer; Agueda Castagna de Vargas (Responsável); Luciane Ribeiro Viana; Jackeline Kirinus

2003 - Atual Clonagem e expressão do gene vapA de *R. equi*

Descrição: A virulência de *R. equi* ocorre pela presença de um plasmídeo que contém o gene vapA. Com o objetivo de produzir insumos no estudo de alternativas sorológicas para identificação de animais infectados, será selecionado o gene completo que codifica para a proteína VapA, para ser clonado e expresso. O fragmento do gene vapA será obtido por PCR, utilizando iniciadores específicos. O fragmento de 570pb, após será subclonado em vetor pUC18 clivado com a enzima SmaI e defosforilado, será eletroporado em células de *Escherichia coli* XL1 Blue. Um clone pUC vapA será digerido com EcoRI e BamHI e o fragmento de 570pb purificado e clonado em vetor de expressão pGEX 4T1. Posteriormente serão feitos estudos da caracterização imunológica da proteína recombinante..

Situação: Em Andamento; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa (Responsável); Cristina Costa Krewer; Mariana Sá e Silva; Agueda Castagna de Vargas

2003 - Atual Determinação do conteúdo de plasmídeos em isolados clínicos e ambientais de *E. coli*

Descrição: A colibacilose é uma das principais enfermidades bacterianas dos suínos. Diferentes patótipos de *E. coli* tem sido associados ao desenvolvimento de enfermidade nestes animais. os fatores de virulência necessários a patogenicidade bacteriana bem como genes de resistência aos antimicrobianos podem ser codificados em plasmídeos. estes elementos genéticos móveis tem sido associada com a transferência da informação gênica nestes isolados. Logo, a determinação da sua presença em isolados clínicos e ambientais de *E. coli* é fundamental para entendimento do potencial patogênico destes isolados. O presente estudo tem por finalidade determinar a presença de plasmídeos em isolados clínicos e ambientais de *E. coli*, bem como a determinação do seu potencial de transferência.

Situação: Em Andamento; Natureza: Pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (3); Doutorado (1);
Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa (Responsável); Agueda Castagna de Vargas; Ederson Bisognin Bortolotto; Guilherme Drescher; Franciele Maboni

2003 - 2006 Agentes etiológicos da mastite bovina no Município de Xanxerê e região

Descrição: A mastite em bovinos está associada a sérios prejuízos nos criatórios. A mastite nestes animais pode ser classificada como subclínica, clínica e crônica. Para o diagnóstico da mastite vários testes podem ser conduzidos, como o teste de CMT (realizado a campo) e CCS, WS e isolamento e cultivo, realizados no laboratório. O presente estudo tem por objetivo a caracterização dos principais agentes bacterianos envolvidos com a mastite em bovinos do Município de Xanxerê e região, bem como determinar a sua sensibilidade aos antimicrobianos. Para tal, leite será colhidos em diversas propriedades dos Estados do PR, SC e RS. As amostras serão remetidas ao laboratório, onde serão realizados os testes de WS para determinar o grau de inflamação da glândula mamária, bem como o isolamento bacteriano. Após a identificação por testes bioquímicos as bactérias serão submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos Kirb Bauer modificado.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (3);
Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa (Responsável); Lilian Kolling; Guilherme Drescher; Andréia Inês Ferronato; Samara Paula Mattiello; Patrícia Bordignon

2002 - 2006 Reação em cadeia da polimerase múltipla para caracterização de isolados clínicos e ambientais de *Rhodococcus equi* do Brasil

Descrição: *Rhodococcus equi* é um microrganismo do solo que causa broncopneumonia piogranulomatosa, linfadenite mesentérica e enterite ulcerativa em potros com menos de 6 meses de idade. A doença pode ser endêmica em algumas regiões ou esporádica em outras, dependendo de condições físicas e de manejo. . A virulência de *R. equi* está relacionada com a capacidade do microrganismo de impedir a fagocitose e multiplicar no interior dos macrófagos, resistindo à eliminação pulmonar e esplênica pelo hospedeiro. Esta atividade é conferida por antígenos termorregulados com 15-17KDa, codificados por plasmídeos de 85-90Kb. Pesquisas relatam que os antígenos de 15-17 KDa são encontrados em todos os isolados clínicos de *R. equi* obtidos de potros, bem como em algumas amostras ambientais. Todas as cepas que apresentam esta proteína são virulentas para camundongos, sugerindo seu importante papel na patogênese da infecção por *R. equi* e sua utilidade como marcador da virulência desta bactéria. Entretanto, amostras desprovidas de plasmídeo de virulência são capazes de ocasionar infecções nos homens e animais. Assim, a PCR multiplex pode ser uma alternativa para diagnosticar de maneira rápida e eficiente a presença desse gene de virulência que codifica

para a proteína VAP do *Rhodococcus equi* isolado dos animais.

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa; Cristina Costa Krewer; Irene Silveira Schrank; Agueda Castagna de Vargas (Responsável); Andreia Henzel

2002 - Atual Clonagem e expressão do gene da proteína de superfície (SAP)

Descrição: Entre as enfermidades reprodutivas que afetam os bovinos, a campilobacteriose venérea bovina (CVB) é de grande relevância, uma vez que por passar muitas vezes despercebida, pode ocasionar sérios prejuízos aos produtores. A CVB é causada principalmente pelo *Campylobacter fetus* e em particular pela subespécie *venerealis*. O habitat natural do *C.fetus* subespécie *venerealis* é o sistema reprodutivo bovino. proteínas de alto peso molecular presentes na superfície bacteriana (Surface Array Protein - SAP), devido aos seu importante papel na patogênese da enfermidade, são candidatas potenciais para o desenvolvimento de métodos sorológicos de diagnóstico e para o preparo de vacinas. Porém as características de cultivo da bactéria muitas vezes dificultam estes estudos. Neste sentido, o uso de proteínas recombinantes pode ser de grande utilidade, permitindo a obtenção de altos níveis de proteínas a um custo relativamente baixo. Os objetivos deste projeto são a clonagem e caracterização do gene *sap* do *Campylobacter fetus*, expressão de SAP recombinantes, testando sua reatividade imunológica.

Situação: Em Andamento; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa; Agueda Castagna Vargas (Responsável); Luciane Ribeiro Viana; Jackeline Kirinus

2002 - 2006 Padronização da técnica de PCR para diagnóstico da campilobacteriose genital bovina

Descrição: A importância da bovinocultura de corte para o país e os baixos índices reprodutivos decorrentes de problemas infecciosos levam a busca de metodologias eficazes para o diagnóstico e controle destas enfermidades. A Campilobacteriose Venérea Bovina (CVB), cuja principal manifestação é a redução nos índices de parição (devido ao aborto e infertilidade), apesar de acarretar prejuízos, tem passado completamente despercebida, devido a natureza subclínica e a dificuldade de diagnóstico. Ela é causada pelo *Campylobacter fetus* subespécie *fetus* e *venerealis*, uma bactéria microaerófila, que além de requerer condições especiais de transporte e cultura, apresenta o crescimento fastidioso e inatividade bioquímica. A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) vem sendo utilizada na identificação de bactérias de difícil isolamento e classificação, porque detecta fragmentos específicos do DNA bacteriano, que se mantém íntegro, mesmo com o agente inviável, diminuindo-se então os cuidados na colheita e conservação das amostras. A padronização da PCR espécie-específica para *Campylobacter fetus* que está sendo proposta pelo presente estudo, tem a intenção de facilitar e apressar o

diagnóstico da Campilobacteriose venérea permitindo uma correta estimativa de sua prevalência em nossos rebanhos.

Situação: Concluído; Natureza: Outra

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa; Agueda Castagna Vargas (Responsável); Luciane Ribeiro Viana; Jackeline Kirinus; Ana Claudia Groff

2001 - Atual Caracterização Molecular de Isolados de Streptococcus equi

Descrição: A adenite eqüina é uma doença contagiosa aguda caracterizada por inflamação mucopurulenta do trato respiratório superior dos eqüinos. é causada pelo S. equi subesp. equi, um agente b-hemolítico pertencente ao grupo C Lancefield. Outros agentes pertencentes ao mesmo grupo como S. equi subesp. zooepidemicus são freqüentemente isolados de amostras clínicas como contaminantes secundários. A diferenciação fenotípica entre estas subespécies é pequena e tradicionalmente é baseada em testes de fermentação de açúcares, entretanto existem cepas de S. equi subesp. equi atípicas que apresentam diferentes padrões de fermentação, dificultando ainda mais sua diferenciação, gerando identificações falhas. O presente trabalho tem por objetivo realizar uma caracterização molecular de isolados de S. equi obtidos de casos clínicos de adenite eqüina. Para tal, seqüências conservadas da região HSP60 serão amplificadas por PCR utilizando-se primers degenerados, e após a amplificação os fragmentos obtidos serão seqüenciados e analisados. Espera-se que a análise destes fragmentos permita a caracterização dos isolados e diferenciação das subespécies de S. equi.

Situação: Em Andamento; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (2);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa; Cristina Costa Krewer; Mariana Sá e Silva; Agueda Castagna de Vargas (Responsável); Jackeline Kirinus

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Número de produções C,T & A: 1/

2001 - Atual Genes envolvidos na patogenicidade de Actinobacillus pleuropneumoniae

Descrição: O projeto visa o estudo dos genes envolvidos na patogenicidade da bactéria Actinobacillus pleuropneumoniae. Visa também o desenvolvimento de métodos rápidos de diagnóstico desta espécie.

Situação: Em Andamento; Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (3); Mestrado acadêmico (2); Doutorado (1);

Integrantes: Mateus Matiuzzi da Costa; Irene Silveira Schrank (Responsável); Catia Cilene Klein; Sergio Ceroni da Silva; Shana Weber

REVISOR DE PERIÓDICO

1 Ciência Rural

Vínculo

2003 -

Vínculo: Revisor da Revista Ciência Rural

ÁREAS DE ATUAÇÃO

1 Medicina Veterinária Preventiva

IDIOMAS

Compreende: Inglês (Bem), Espanhol (Pouco)

Fala: Inglês (Bem), Espanhol (Pouco)

Lê: Inglês (Bem), Espanhol (Bem)

Escreve: Inglês (Bem), Espanhol (Pouco)

PRODUÇÃO EM C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. COSTA, M. M., SILVA, M. S. E., SPRICIGO, D. A., WITT, N., MARCHIORO, S. B., KOLLING, L., VARGAS, A. C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.26, p.5-8, 2006.
2. COSTA, M. M., KREWER, C. C., MACHADO, S. A., FIGHERA, R. A., GRAÇA, D. L., VARGAS, A. C., MATTOSGUARALDI, A. L., ILHA, M. R. S. Pathogenicity of *Rhodococcus equi* isolates from human, horse clinical and environment in immunodeficient mice. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.26, p.167-170, 2006.
3. COSTA, M. M., VARGAS, A. C., GROFF, A. C. M., KIRINUS, J., VIANA, L. R., SILVA, M. S. E. PCR for the diagnosis of bovine genital campylobacteriosis. *Veterinary Microbiology*, 2006.
4. COSTA, M. M., VARGAS, A. C., SILVA, M. S. E., GROFF, A. C. M., BARRETTA, C., BOTTON, S. A. Phenotypical assays and partial sequencing of the hsp60 gene for identification of *Streptococcus equi*. *Current Microbiology*, 2006.
5. MEURER, F., HAYASHI, C., COSTA, M. M., MAUERWERK, V., FRECCIA, A. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para tilápias do nilo durante o período de reversão sexual submetidas a um desafio sanitário. *Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science*, v.35, p.1881-1886, 2006.

6. COSTA, M. M., VARGAS, A. C., SPRICIGO, D. A., VIANA, L. R., CECIM, M. Isolamento de *Campylobacter jejuni* em feto ovino abortado: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, p.317-320, 2005.
7. COSTA, M. M., VARGAS, A. C., KREWER, C. C., GROFF, A. C. M., VIANA, L. R., SPRICIGO, D. A., KIRINUS, J. Susceptibilidade antimicrobiana de *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* isolado de bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.25, p.1-3, 2005.
8. COSTA, M. M., KLEIN, Catia Cilene, BALESTRIM, Raquel, SCHRANK, Augusto, SILVA, S. C., PIFFER, Itamar Antonio, SCHRANK, Irene Silveira, VAZ, C. S. L., COLLARES, R. M. Aspectos fenotípicos, genotípicos e de diagnóstico da bactéria *A. pleuropneumoniae*. *Ciência Rural*, v.34, p.1305-1313, 2004.
9. VARGAS, A. C., LOUGERCIO, A. P., WITT, N., COSTA, M. M., SILVA, M. S. E., VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato alcoólico de propólis. *Ciência Rural*, v.34, p.159-163, 2004.
10. COSTA, M. M., KLEIN, Catia Cilene, BALESTRIM, Raquel, SCHRANK, Augusto, PIFFER, Itamar Antonio, SILVA, Sergio Ceroni da, SCHRANK, Irene Silveira. Evaluation of PCR based on gene *apxIVA* associated to 16S rDNA sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related species. *Current Microbiology*, v.48, p.189-195, 2004.
11. COSTA, M. M., VARGAS, A. C., VAINSTEIN, M. H., NEVES, J. P., KREUTZ, L. C. Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.93, p.121-132, 2003.
12. VARGAS, A. C., COSTA, M. M., VAINSTEIN, M. H., KREUTZ, L. C., NEVES, J. P. *Campylobacter fetus* subspecies *venereallis* surface array protein from bovine isolates in Brazil. *Current Microbiology*, v.45, p.111-114, 2002.
13. COSTA, M. M., VARGAS, A. C., ALEIXO, J. A. G., LOUGERCIO, A. P. ELISA indireto na detecção de *Salmonella* spp. em língua suína. *Ciência Rural*, v.32, p.1057-1062, 2002.
14. COSTA, M. M. Agentes infecciosos isolados de *Chinchilla laniger*: Relato de caso. *Ciência Rural*, v.31, p.337-340, 2001.
15. COSTA, M. M., BOIJINK, C. L., BRANDÃO, D. A., VARGAS, A. C., RENOSTRO, A. V. Inoculação de suspensão bacteriana de *Plesiomonas shigelloides* em jundiá (*Rhamdia quelen*). *Ciência Rural*, v.31, p.497-501, 2001.
16. COSTA, M. M., BOIJINK, C. L., BRANDÃO, D. A., RENOSTRO, A. V., VARGAS, A. C. Inoculação de suspensão bacteriana de *Plesiomonas shigelloides* em Jundiá, *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI:PIMELODIDAE). *Ciência Rural*, v.31, p.497-501, 2001.
17. COSTA, M. M., LOUGERCIO, A. P., SILVA, W. P., ALEIXO, J. A. G., VARGAS, A. C. *Listeria monocytogenes*: Um importante patógeno de origem alimentar. *Revista*

Higiene Alimentar, v.15, p.39-48, 2001.

18. COSTA, M. M., SILVA, D. A., VARGAS, A. C., ALIEVI, M., SCHOELER, J. E., SILVA, T. R. Gluconato de clorexidina ou álcool-iodo-álcool na anti-sepsia de campo operatório em cães. *Ciência Rural*, v.30, p.431-437, 2000.

19. COSTA, M. M. Identificação de bactérias isoladas de jundiás (*Rhandia quelen*) cultivados em sistemas semi-intensivo. *Ciência Rural*, v.30, p.293-298, 2000.

20. COSTA, M. M., HEADLEY, S. A., GRAÇA, D. L., VARGAS, A. C. Canine distemper virus infection with secondary *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in dogs - Case report. *Ciência Rural*, v.29, p.741-743, 1999.

21. COSTA, M. M., LAZZARI, A., DUTRA, V., FLORES, L. A., VARGAS, A. C. Aspectos epidemiológicos do *Rhodococcus equi* em eqüinos do município de Bagé, RS, Brasil. *Ciência Rural*, v.27, p.441-446, 1997.

22. COSTA, M. M., LAZZARI, A., DUTRA, V., ARAUJO, L., CASTAGNA, L., VARGAS, A. C. Patogenicidade de isolados clínicos e ambientais do *Rhodococcus equi* em camundongos. *Veterinária Técnica*, v.7, p.24-30, 1997.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (completo)

1. COSTA, M. M., FERREIRA, B. J. M., OLIVEIRA, J. S., BORGES, M. M., MULLER, M., MEURER, F. AGENTES BACTERIANOS ISOLADOS DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE OVINOS In: IV Congresso Nordestino de Produção Animal, 2006, Petrolina. **Anais do IV Congresso Nordestino de Produção Animal**. Petrolina: EMBRAPA, 2006. p.1146-1148

2. MEURER, F., COLPINI, L. M. S., COSTA, M. M., SILVA, M. S. E., BOMBARDELLI, R. A. DENSIDADE DE ESTOCAGEM DA TILÁPIA DO NILO DURANTE A PRIMEIRA QUINZENA DA In: IV Congresso Nordestino de Produção Animal, 2006, Petrolina. **Anais do IV Congresso Nordestino de Produção Animal**. Petrolina: EMBRAPA, 2006. p.198-200

3. OLIVEIRA, J. S., SILVA, C. S. R., GALVAO, G. A., MEURER, F., COSTA, M. M. FITOPLÂNCTON NA ALIMENTAÇÃO DE PEIXES EM CRIATÓRIO DO MUNICÍPIO DE PETROLINA In: IV Congresso Nordestino de Produção Animal, 2006, Petrolina. **Anais do IV Congresso Nordestino de Produção Animal**. PETROLINA: EMBRAPA, 2006. p.188-190

4. COSTA, M. M., OLIVEIRA, J. S., MEURER, F., MELO, K. C. B., OLIVEIRA, S. T. L. MICROBIOTA BACTERIANA DE CARPAS (*Cyprinus carpio*) CULTIVADAS EM SISTEMA SEMIINTENSIVO In: IV Congresso Nordestino de Produção Animal, 2006, Petrolina. **Anais do IV Congresso Nordestino de Produção Animal**. Petrolina: EMBRAPA, 2006. p.191-193

5. MEURER, F., SILVA, M. S. E., COLPINI, L. M. S., COSTA, M. M., FRECCIA, A.,

MAUERWERK, V. NÍVEL DE ARRAÇOAMENTO NA REVERSÃO SEXUAL DA TILÁPIA DO NILO In: IV Congresso Nordestino de Produção Animal, 2006, Petrolina. **Anais do IV Congresso Nordestino de Produção Animal**. Petrolina: EMBRAPA, 2006. p.201-204

6. COSTA, M. M., VARGAS, A. C., MEURER, F., MULLER, M., MOURA, M. C. CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE FILÉS DE TILÁPIA DO NILO (“OREOCHROMIS NITICUS”) E JUNDIÁ (“RHAMIDIA” SP.) In: 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004, Campo grande, MS. **41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2004.

7. COSTA, M. M., BOBLINSKI, A. F., HAYASHI, C., MEURER, F., PIETROBELLI, L., MULLER, M. MICROFLORA INTESTINAL DE TILÁPIA DO NILO (“OREOCHROMIS NILOTICUS”) ALIMENTADAS COM RAÇÃO CONTENDO PROBIÓTICO (“SACCHAROMYCES CEREVISIAE”) In: 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004, Campo Grande, MS. **41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2004.

8. COSTA, M. M., HAYASHI, C., MEURER, F., FRECCIA, A., MULLER, M., BOSCOLO, R. J. USO DA SACCHAROMYCES CEREVISIAE COMO PROBIÓTICO PARA TILÁPIA DO NILO (OREOCHROMIS NILOTICUS) DURANTE O PERÍODO DE REVERSÃO SEXUAL In: 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004, Campo Grande, MS. **41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2004.

9. COSTA, M. M., GROFF, A.C.M., SILVA, M. S. E. SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* ISOLADO DE BOVINOS In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia2003, 2003, Florianópolis-SC. **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia2003**, 2003.

10. COSTA, M. M., BOIJINK, C. L., VARGAS, A. C., RADUNZ, J. L., BRANDÃO, D. A. Efeito da inoculação de suspensão bacteriana de *Plesiomonas shigelloides* e da presença de *Aeromonas hydrophila* na água do cultivo de jundiá (*Rhamdia quelen*) In: XXXVI REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 1998, Porto Alegre, 1998.

11. COSTA, M. M., LAZZARI, A., DUTRA, V., CASTAGNA, L., PEDROZO, A. F., VARGAS, A. C. Avaliação de dois testes sorológicos na detecção de anticorpos contra o *Rhodococcus equi* no soro de eqüinos vacinados. In: JORNADA INTEGRADA DE PESQUISA E EXTENSÃO E ENSINO III. **JORNADA INTEGRADA DE PESQUISA E EXTENSÃO E ENSINO III**, 1996. p.580-580

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

1. BIONDO, N., PRESOTTO, R., COSTA, M. M., HERMES, R. A., DRESCHER, G., KREWER, C. C. AGENTES FÚNGICOS DA DERMATOFITOSE NOS CÃES E GATOS DE In: V Seminário de Iniciação Científica da UNOESC, 2006, Videira. **Anais do V Seminário de Iniciação Científica da UNOESC**. Joaçaba: UNOESC,

2006.

2. MATTIELLO, S. P., DRESCHER, G., KOLLING, L., MATTIELLO, M., COSTA, M. M., ROCHA, D., KREWER, C. C. APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS EM TANQUE (CBT) PARA MONITORAMENTO DA MASTITE BOVINA EM PROPRIEDADE DO MUNICÍPIO DE XANXERÊ – SC In: V Seminário de Iniciação Científica da UNOESC, 2006, Videira. **Anais do V Seminário de Iniciação Científica da UNOESC**. Joaçaba: UNOESC, 2006.

3. PICCINI, C., ROCHA, D., BORDIGNON, P., COSTA, M. M., KOLLING, L., DRESCHER, G., KREWER, C. C. AVALIAÇÃO DE VACINAS CONTRA A PNEUMONIA MICOPLÁSMICA DOS SUÍNOS In: V Seminário de Iniciação Científica da UNOESC, 2006, Videira. **Anais do V Seminário de Iniciação Científica da UNOESC**. Joaçaba: UNOESC, 2006.

4. DRESCHER, G., COSTA, M. M., MACIEL, M. N., MATTIELLO, S. P., PICCINI, C. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados causadores de mastite em ovelhas do Município de Xanxerê, SC. In: XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 2006, Gramado. **Anais do XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária**. Gramado: SOVERGS, 2006.

5. DRESCHER, G., PRESOTTO, R., MATTIELLO, S. P., COSTA, M. M., PICCINI, C., FERRONATO, A. I., KREWER, C. C. CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE R. equi E GENE VapA ATRAVÉS DO PCR MULTIPLEX In: V Seminário de Iniciação Científica da UNOESC, 2006, Videira. **Anais do V Seminário de Iniciação Científica da UNOESC**. Joaçaba: UNOESC, 2006.

6. WEBER, S., COSTA, M. M., SILVA, M. S. E., MABONI, F., FERRONATO, A. I., DRESCHER, G., VARGAS, A. C., SCHRANK, Irene Silveira. Caracterização molecular e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados clínicos e ambientais de E. coli In: XXV Reunião de Genética de Microrganismos, 2006, São Pedro. **Anais da XXV Reunião de Genética de Microrganismos**. São Pedro: XXVREGEM, 2006. p.102-102

7. COSTA, M. M., PRATI, L. A., SELLIG, A., SONAGLIO, F. Identificação e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos de maior frequência em cadelas e gatas submetidas a ovariectomia In: XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 2006, Gramado. **Anais do XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária**. Porto Alegre: SOVERGS, 2006.

8. BORDIGNON, P., SIMON, A., FERRONATO, A. I., MATTIELLO, S. P., DRESCHER, G., COSTA, M. M., KREWER, C. C. TUBERCULOSE BOVINA NO OESTE DE SC - RELATO DE CASOS In: V Seminário de Iniciação Científica da UNOESC, 2006, Videira. **Anais do V Seminário de Iniciação Científica da UNOESC**. Joaçaba: UNOESC, 2006.

9. COSTA, M. M., PRADO, J. O. O., PICCINI, C., DRESCHER, G., FERRONATO, A. I., VIEL, F. AGENTES ETIOLÓGICOS DA MASTITE BOVINA NA REGIÃO DE XANXERÊ In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E

EXTENÇÃO, 2005, Joaçaba-SC. **IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENÇÃO.** Joaçaba: UNOESC, 2005. v.I. p.36-36

10. COSTA, M. M., KOLLING, L., DRESCHER, G., PICCINI, C., MATTIELLO, S. P. ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA NO REBANHO LEITEIRO DO MUNICÍPIO DE XANXERÊ E REGIÃO In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2005, Joaçaba-SC. **IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO.** Joaçaba: UNOESC, 2005. v.I. p.37-37

11. COSTA, M. M., KOLLING, L., CORSO, B. M., KREUTZ, L. C., BORDIGNON, P. ASPÉCTOS VISUAIS DE ACONDICIONAMENTO E DE CONSUMO DE OVOS DE GALINHA COMERCIALIZADOS EM CHAPECÓ-SC In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2005, Joaçaba-SC. **IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO.** Joaçaba: UNOESC, 2005. v.I. p.38-38

12. COSTA, M. M., FERRONATO, A. I., DRESCHER, G., KOLLING, L., BORDIGNON, P. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE RHODOCOCCLUS EQUI E ESPÉCIES RELACIONADAS In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2005, Joaçaba-SC. **IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO.** Joaçaba-SC: UNOESC, 2005.

13. COSTA, M. M., FERRONATO, A. I., PICCINI, C., PRADO, J. O. O., PRESOTTO, R. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE E. COLI UROPATOGÊNICAS EM SUÍNOS In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2005, Joaçaba-SC. **IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO.** Joaçaba-SC: UNOESC, 2005.

14. COSTA, M. M., BIANCHESSI, B., DRESCHER, G., PRESOTTO, R., BIONDO, N., INVITI, F. CONTAGEM BACTERIANA DE INTESTINO DE CARPAS (CYPRINUS CARPIO) E TILÁPIAS (OREOCHROMIS NILOTICUS) In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2005, Joaçaba-SC. **IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO.** Joaçaba-SC: UNOESC, 2005.

15. COSTA, M. M., MATTIELLO, S. P., SALAMI, G., MARTARELLO, V., PIVA, J.

IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS OBTIDAS DE ÁGUA E LODO DO RIO DITINHO In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2005, Joaçaba-SC. **IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO.** Joaçaba-SC: UNOESC, 2005.

16. COSTA, M. M., SARTORETTO, A., PRADO, J. O. O., KOLLING, L., DRESCHER, G., MATTIELLO, M. ISOLAMENTO DE NOCARDIA BRASILIENSIS EM CASO DE LINFADENITE INTRAMAMÁRIA EM BOVINOS: RELATO DE CASO In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2005, Joaçaba-SC. **IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO.** Joaçaba-SC: UNOESC, 2005.

17. COSTA, M. M., KOLLING, L., PRADO, J. O. O., PICCINI, C., BIANCHETTI, B. MICROBIOTA BACTERIANA DE CARPAS (CYPRINUS CARPIO) CULTIVADAS EM SISTEMA SEMI - INTENSIVO In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2005, Joaçaba-SC. **IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO.** Joaçaba-SC: UNOESC, 2005.

18. COSTA, M. M., MARTARELLO, V., BARBIERI, G., SALAMI, G., BIONDO, N. NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS NAS ÁGUAS DO RIO DITINHO - DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESCHERICHIA COLI In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2005, Joaçaba-SC. **IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO.** Joaçaba-SC: UNOESC, 2005.

19. COSTA, M. M., FERRONATO, A. I., SARTORETTO, A., PICCINI, C., FORCHESATTO, S. PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS OBTIDAS DE CARPAS (CYPRINUS CARPIO) In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2005, Joaçaba-SC. **IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO.** Joaçaba-SC: UNOESC, 2005.

20. COSTA, M. M., MAUERWERK, M. T., MOURA, M. C., PIETROBELLI, L., NICOLA, P.A., PEREIRA, L.C.M., VARGAS, A. C. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de Escherichia coli em monos-carvoeiros, Brachyteles arachnoides (Atelinae, Primates) In: XI Congresso Brasileiro de Primatologia, 2005, Porto Alegre. **XI Congresso Brasileiro de primatologia - Livro de Resumos,** 2005.

21. COSTA, M. M., CORSO, B. M., BORTOLOTTI, E. B., DRESCHER, G.,

BORDIGNON, P. PESQUISA DE COLIFORMES E SALMONELLA SPP. EM ÁGUA CONSUMIDA NOS AVIÁRIOS DO MUNICÍPIO DE CHAPECÓ, SC In: IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2005, Joaçaba-SC. **IV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ III SEMINÁRIO DE PESQUISA/ II MIEPE MOSTRA INTEGRADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**. Joaçaba-SC: UNOESC, 2005.

22. VARGAS, A. C., COSTA, M. M., HENZEL, A., SPRICIGO, D. A., KREWER, C. C., SILVA, M. S. E. Análise de isolados de R. equi oriundos de humanos e equinos pela técnica de RAPD In: XXIV Reunião da Sociedade de Genética de Microrganismos, 2004, Gramado. **XXIV Reunião da Sociedade de Genética de Microrganismos**, 2004. v.01. p.93-93

23. WEBER, S., COSTA, M. M., SILVA, Sergio Ceroni da, SCHRANK, I. Clonagem e expressão em E.coli do gene apXIVA de Actinobacillus pleuropneumoniae In: XXIV Reunião da Sociedade de Genética de Microrganismos, 2004, Gramado. **XXIV Reunião da Sociedade de Genética de Microrganismos**, 2004. v.01. p.109-109

24. COSTA, M. M., PIETROBELLI, L., BOBLINSKI, A. F., FRECCIA, A., MULLER, M., NICOLA, P. A. CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE FILÉS CONGELADOS DE TILÁPIA E JUNDIÁ In: XII Seminário de iniciação Científica e VI Mostra de Pesquisa da PUCPR, 2004, Curitiba, PR. **Caderno de Resumos**, 2004.

25. COSTA, M. M., FRECCIA, A., BOBLINSKI, A. F., PERTILE, D., NICOLA, P. A. DENSIDADE POPULACIONAL SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DA TILÁPIA DO NILO DURANTE A PRIMEIRA QUINZENA DA REVERSÃO SEXUAL In: XII Seminário de Iniciação Científica e VI Mostra de Pesquisa da PUCPR, 2004, Curitiba, PR. **Caderno de Resumos**, 2004.

26. VARGAS, A. C., COSTA, M. M. Diagnóstico e Pesquisa empregando métodos moleculares em bacteriologia veterinária In: XXIV Reunião da Sociedade de Genética de Microrganismos, 2004, Gramado. **XXIV Reunião da Sociedade de Genética de Microrganismos**, 2004. v.01. p.46-46

27. COSTA, M. M., FRECCIA, A., MEURER, F., VARGAS, A. C., PIETROBELLI, L. DINÂMICA NA COLONIZAÇÃO MICROBIANA DO TRATO DIGESTIVO DE LARVAS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) COM E SEM A SUPLEMENTAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* In: VIII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, 2004, Laguna. **RESUMOS**, 2004.

28. CASTRO, L., COSTA, M. M., ALIEVI, M., CHEMALE, G., SCHRANK, Irene Silveira, ZAHA, A., VAINSTEIN, M. H., FERREIRA, H.B. Expressão e avaliação do potencial imunodiagnóstico das proteínas recombinantes p36 e NRDF de *Mycoplasma hyopneumoniae* na pneumonia micoplásmica suína In: XXIV Reunião da Sociedade de Genética de Microrganismos, 2004, Gramado. **XXIV Reunião da Sociedade de Genética de Microrganismos**, 2004. v.01. p.217-217

29. COSTA, M. M., FRECCIA, A., MEURER, F., MULLER, M., MAUERWERK, M. T., BELE, D.C. MICROBIOTA INTESTINAL DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis*

niloticus) ALIMENTADAS COM RAÇÃO CONTENDO PROBIÓTICO (Saccharomyces cerevisiae) In: VIII Encontro Brasileiro de Patologia de Organismos Aquáticos, 2004, Laguna. **RESUMOS**, 2004.

30. COSTA, M. M., MEURER, F., PIETROBELLI, L., MOURA, M. C., PERTILE, D., MAUERWERK, V. MICROFLORA INTESTINAL DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADAS COM LEVEDURA VIVA COMO PROBIÓTICO In: XII Seminário de Iniciação Científica e VI Mostra de Pesquisa da PUCPR, 2004, Curitiba, PR. **Caderno de Resumos**, 2004.

31. VARGAS, A. C., COSTA, M. M., VIANA, L. R., SPRICIGO, D. A., KIRINUS, J., GROFF, A. C. M. Padronização da técnica de PCR para o diagnóstico da campilobacteriose venérea bovina In: XXIV Reunião da Sociedade de Genética de Microrganismos, 2004, Gramado. **XXIV Reunião da Sociedade de Genética de Microrganismos**, 2004. v.01. p.94-94

32. COSTA, M. M., FRECCIA, A., MEURER, F., KRAMPE, C. R., BELEN, D. C. USO DA LEVEDURA VIVA COMO PROBIÓTICO PARA LARVAS DE TILÁPIA DO NILO In: XII Seminário de Iniciação Científica e VI Mostra de Pesquisa da PUCPR, 2004, Curitiba, PR. **Caderno de Resumos**, 2004.

33. COSTA, M. M., FRECCIA, A., PERTILE, D., MEURER, F., MOURA, M. C. USO DA LEVEDURA VIVA COMO PROBIÓTICO PARA LARVAS DE TILÁPIA DO NILO COM DESAFIO SANITÁRIO In: XII Seminário de Iniciação Científica e VI Mostra de Pesquisa da PUCPR, 2004, Curitiba, PR. **Caderno de Resumos**, 2004.

34. COSTA, M. M., MEURER, F., A.Freccia, V. Mauerwerk, DOBLINSKI, A., HAYASHI, C. USO de Saccharomyces cerevisiae COMO PROBIÓTICO PARA ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO(Oreochromis niloticus) COM DESAFIO SANITÁRIO In: VIII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, 2004, Laguna. **RESUMOS**, 2004.

35. COSTA, M. M., ALMEIDA, E. R., SANTOS, L. F. B., KOLLING, L., MARCHIORO, S. B., KIRINUS, J., BORTOLOTTI, E. B., VARGAS, A. C., BUZATO, A. M., FAVERO, J. G. T. ENZILIMP AS-500 R: ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E NO TRATAMENTO DOS DEJETOS SUÍNOS In: II Congresso Intercursos do Centro de Ciências Sociais Aplicadas, V Seminário de Iniciação Científica, 2003, Xanxerê, SC. **II CONCESA**, 2003.

36. COSTA, M. M., ALMEIDA, E. R., SANTOS, L. F. B., KOLLING, L., MARCHIORO, S. B., KIRINUS, J., BUZATO, A. M., FAVERO, J. G. T., BORTOLOTTI, E. B., VARGAS, A. C. ENZILIMP: Estudo da atividade antimicrobiana e no tratamento de dejetos suínos In: II Congresso Intercursos do centro de Ciências Sociais Aplicadas; V seminário de Iniciação científica, 2003, Xanxerê. **Anais do II CONCESA**. Xanxerê: New Print, 2003. v.I. p.215-215

37. SANTOS, L. F. B., KOLLING, L., ALMEIDA, E. R., SPRICIGO, D. A., BORTOLOTTI, E. B., COSTA, M. M., VARGAS, A. C. Susceptibilidade de isolados clínicos e ambientais de Rhodococcus equi In: II Congresso Intercurso do Centro de Ciências Sociais Aplicadas; V Seminário de Iniciação Científica, 2003, Xanxere.

38. COSTA, M. M., SANTOS, L. F. B., KOLLING, L., ALMEIDA, E. R., BORTOLOTTI, E. B., SPRICIGO, D. A., VARGAS, A. C. SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Rhodococcus equi* AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS In: II Congresso Intercursos do Centro de Ciências Sociais Aplicadas, V Seminário de Iniciação Científica, 2003, Xanxerê, SC. **II CONCESA**, 2003.

39. COSTA, M. M., BALESTRIM, Raquel, KLEIN, Catia Cilene, PIFFER, I., SILVA, S. C., SCHRANK, I. Aplicação da técnica de PCR para o gene *apxIVA* associada ao seqüenciamento do rDNA 16S na caracterização de *A. pleuropneumoniae* e espécies relacionadas. In: X CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS DE SUÍNOS, 2001, Porto Alegre. **X CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS DE SUÍNOS**, 2002. p.25-25

40. COSTA, M. M., DUTRA, V., WEISS, L. H. N., SPRICIGO, D. A., NAKZATO, L., WITT, N., LOUGERCIO, A. P., VAINSTEIN, M. H., VARGAS, A. C. Comparação dos métodos fenotípicos e da reação em cadeia da polimerase (PCR) para caracterização de fímbrias e toxinas de isolados de *Escherichia coli* obtidos de suínos com colibacilose neonatal. In: XXIII REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 2002, Pirenópolis. **XXIII REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS**, 2002.

41. COSTA, M. M., VARGAS, A. C., WITT, N. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) PARA DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR *Campylobacter fetus* EM BOVINOS. In: XVII JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA DA UFSM, 2002, Santa Maria-RS. **ANAIS DA XVII JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA SANTA MARIA**, 2002.

42. COSTA, M. M., KREWER, C. C., SILVA, M. S. E., LAZZARI, A., MATTOSGUARALDI, A. L., NAPOLEÃO, F., VAINSTEIN, M. H., SCHRANK, Irene Silveira, SCHRANK, Augusto, VARGAS, A. C. Utilização da técnica de PCR multiplex para caracterização molecular de isolados de *Rhodococcus equi* de haras da região de Bagé, RS, Brasil. In: XXIII REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 2002, Pirenópolis. **XXIII REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS**, 2002.

43. COSTA, M. M., LOUGERCIO, A. P., HENZEL, A., KREWER, C. C., VIANA, L. R., VARGAS, A. C. Isolamento de *Salmonella* sp. Em linguças suínas tipo frescal comercializadas em Santa Maria, RS. In: XV JORNADA INTEGRADA DE PESQUISA EXTENSÃO E ENSINO, 2000, Santa Maria. **XV JORNADA INTEGRADA DE PESQUISA EXTENSÃO E ENSINO**, 2000.

44. COSTA, M. M., LAZZARI, A., RENOSTRO, A. V., WITT, N., VARGAS, A. C. Avaliação *in vitro* do efeito antibacteriano na própolis. In: XIV CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA & III CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL, 1999, Gramado. **XIV CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA & III CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO**

CONE SUL, 1999. p.317-317

45. COSTA, M. M., MACHADO, S. A., FERNANDES, A. F., DEZEN, D., VARGAS, A. C. Inoculação de isolados clínicos e ambientais do *Rhodococcus equi* em camundongos imunossuprimidos In: **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 1999, Salvador. **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 1999. p.164-164

46. COSTA, M. M., NAPOLEÃO, F., CAMELLO, T., VARGAS, A. C., ROSA, A., MATTOSGUARALDI, A. L. Pesquisa de plasmídeo de virulência de 85-90 Kb pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) em amostras de *Rhodococcus equi* de ongens diversas - meio ambiente, animais e humanos In: **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 1999, Salvador. **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 1999. p.99-99

47. COSTA, M. M., KREWER, C. C., NAPOLEÃO, F., CAMELLO, T., VARGAS, A. C., MATTOSGUARALDI, A. L. Pesquisa de portadores de *Rhodococcus equi* entre trabalhadores rurais. In: **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 1999, Salvador. **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 1999.

48. COSTA, M. M., CASTAGNA, L., BOIJINK, C. L., VARGAS, A. C. Avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos de bactérias isoladas de jundiá (*Rhamdia quelen*) In: **XIII JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA**, 1998, Santa Maria, 1998. p.354-354

49. COSTA, M. M., WEISS, L. H. N., LAZZARI, A., KLAUSS, M., PEDROZO, A. F., CASTAGNA, L., VARGAS, A. C. Botulismo em bovinos confinados no RS: relato de caso. In: **XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA**, 1997, Gramado, 1997. p.308-308

50. COSTA, M. M., WEISS, L. H. N., LAZZARI, A., CASTAGNA, L., ARAUJO, L., FERNANDES, A. F., FRANCISCATTO, C., VARGAS, A. C. Patogenicidade de Isolados Clínicos e Ambientais do *Rhodococcus equi* em camundongos In: **CONGRESSO BRASILEIRO**, 1997.

51. COSTA, M. M., FERNANDES, A. F., WEISS, L. H., FERNANDES, A. F., VARGAS, A. C. Agentes microbianos mais comuns nas otites e dermatites de caninos em Santa Maria - RS In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARJA**, XXIV, 1996, Goiânia. **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARJA**, XXIV, 1996. p.57-57

52. COSTA, M. M., FONTANA, F. Z., WEISS, L. H. N., LAZZARI, A., FERREIRA, G. L., FLORES, L. A., VARGAS, A. C. Efeito in vitro do Extrato de Própolis e antimicrobianos nos agentes mais comuns nas otites e dermatites de caninos. In: **JORNADA INTEGRADA DE PESQUISA EXTENSÃO E ENSINO**, II., Santa Maria. **JORNADA INTEGRADA DE PESQUISA EXTENSÃO E ENSINO**, II, 1995. p.522-522

53. COSTA, M. M., LAZZARI, A., FERNANDES, A. F., MEDEIROS, M., VARGAS, A. C. Perfil de sensibilidade bacteriana 'in vitro' a norfloxacin. In: **JORNADA INTEGRADA DE PESQUISA EXTENSÃO E ENSINO**, II., 1995, Santa Maria.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo expandido)

1. COSTA, M. M., SILVA, M. S. E., WEBER, S., KOLLING, L., DRESCHER, G., VARGAS, A. C., SCHRANK, Irene Silveira, MABONI, F. Resistência ao antimicrobianos e presença de plasmídeos em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli* In: XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, 2005, Fortaleza. **Anais do XII Congresso Brasileiro da ABRAVES**. Fortaleza: Comissão Científica do XII congresso da ABRAVES, 2005. v.2. p.7-8
2. COSTA, M. M., KLEIN, Catia Cilene, PIFFER, Itamar Antonio, SILVA, Sergio Ceroni da, SCHRANK, I. *Actinobacillus pleuropneumoniae* e espécies relacionadas: Genes *apxIVA* e *rDNA 16S* In: XI Congresso da ABRAVES, 2003, Goiânia. **Anais do XI Congresso da ABRAVES**. Concórdia: Embrapa, 2003. v.II. p.21-22
3. VARGAS, A. C., SILVA, M. S. E., COSTA, M. M., GROFF, A.C.M., WITT, N., KOLLING, L. Perfil epidemiológico, molecular e de resistência aos antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos In: XI Congresso da ABRAVES, 2003, Goiânia. **Anais do XI Congresso da ABRAVES**. Concórdia: Embrapa, 2003. v.II. p.3-4

Orientações e Supervisões concluídas

Iniciação científica

1. Guilherme Drescher. **Anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina no rebanho leiteiro do Município de Xanxerê e região**. 2005. Iniciação científica - Universidade do Oeste de Santa Catarina
2. Cristiano Piccini. **Avaliação de vacina comercial contra a pneumonia enzoótica dos suínos**. 2004. Iniciação científica - Universidade do Oeste de Santa Catarina
3. Guilherme Drescher. **Caracterização molecular de isolados de *R. equi* obtidos de búfalos e javalis**. 2004. Iniciação científica - Universidade do Oeste de Santa Catarina
4. Andreia Ines Ferronato. **Caracterização molecular e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *E. coli* uropatogênica**. 2004. Iniciação científica - Universidade do Oeste de Santa Catarina
5. Lyvia Maria Benedect. **Padronização da técnica da PCR para detecção de *E. coli* verotoxigênicas em produtos carneos suínos**. 2004. Iniciação científica - Universidade do Oeste de Santa Catarina

6. Lilian Kolling. **Caracterização molecular, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em isolados de E. coli obtidos de criatórios suínos.** 2003. Iniciação científica - Universidade do Oeste de Santa Catarina

Participação em eventos

1. **XI CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS DE SUÍNOS,** 2003. (Congresso) XI CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS DE SUÍNOS.

2. **XXIII REUNIÃO DA SOCIEDADE DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS,** 2002. (Encontro) XXIII REUNIÃO DA SOCIEDADE DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS.

3. **CURSO DE BIOINFORMÁTICA APLICADA,** 2001. (Outra) CURSO DE BIOINFORMÁTICA APLICADA.

4. **CURSO TEÓRICO-PRÁTICO DE PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM E.COLI,** 2001. (Outra) CURSO TEÓRICO-PRÁTICO DE PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM E.COLI.

5. **ENCONTRO DA RED DE INVESTIGACION Y ENTRENAMIENTO EN ENFERMEDADESPARASITARIAS DEL CONO SUR DE AMERICA LATINA,** 2001. (Encontro) ENCONTRO DA RED DE INVESTIGACION Y ENTRENAMIENTO EN ENFERMEDADESPARASITARIAS DEL CONO SUR DE AMERICA LATINA.

6. **X CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS DE SUÍNOS,** 2001. (Congresso) X CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS DE SUÍNOS.

7. **MINI-CURSO: DIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE,** 2000. (Outra) MINI-CURSO: DIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE.

8. **CURSO AVANÇOS EM REPRODUÇÃO BOVINA,** 1999. (Outra) CURSO AVANÇOS EM REPRODUÇÃO BOVINA.

9. **CURSO DE CARDIOLOGIA E EMERGÊNCIAS VETERINÁRIAS,** 1999. (Outra) CURSO DE CARDIOLOGIA E EMERGÊNCIAS VETERINÁRIAS.

10. **CURSO: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E BASTONETES GRAM NEGATIVOS,** 1999. (Outra) CURSO: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E BASTONETES GRAM NEGATIVOS.

11. **CURSO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO E CLÍNICA EQUINA,** 1999. (Outra) CURSO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO E CLÍNICA EQUINA.

12. **UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA OTROLE DE PATÓGENSO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS,** 1999. (Outra) UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA OTROLE DE PATÓGENSO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS.

13. **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 1999. (Congresso) XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA.

14. **II CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL, XIII CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA E XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 1998. (Congresso) II CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL, XIII CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA E XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA.

15. **SEMINÁRIO MILLIPORE DE MICROBIOLOGIA DE ÁGUAS DE BEBIDA**, 1998. (Seminário) SEMINÁRIO MILLIPORE DE MICROBIOLOGIA DE ÁGUAS DE BEBIDA.

16. **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HERPESVÍRUS BOVINOS E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA**, 1998. (Simpósio) SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE HERPESVÍRUS BOVINOS E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA.

17. **VIII ENCORTE- ENCRONTO DE RAÇAS BOVINAS DE CORTE DO CENTRO DO ESTADO DO RS**, 1998. (Encontro) VIII ENCORTE- ENCRONTO DE RAÇAS BOVINAS DE CORTE DO CENTRO DO ESTADO DO RS.

18. **CURSO DE ATUALIZAÇÃO SOBRE PARASITOSSES DE RUMINANTES-EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE**, 1997. (Outra) CURSO DE ATUALIZAÇÃO SOBRE PARASITOSSES DE RUMINANTES-EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE.

19. **CURSO DE ENFERMIDADES CONFUNDÍVEIS COM FEBRE AFTOSA**, 1997. (Outra) CURSO DE ENFERMIDADES CONFUNDÍVEIS COM FEBRE AFTOSA.

20. **XV SEMINÁRIO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA DA REGIÃO SUL**, 1997. (Seminário) XV SEMINÁRIO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA DA REGIÃO SUL.

21. **ENCONTRO INTERNACIONAL DE VIROLOGIA MOLECULAR**, 1996. (Encontro) ENCONTRO INTERNACIONAL DE VIROLOGIA MOLECULAR.

22. **SEMANA ACADÊMICA DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 1995. (Outra) SEMANA ACADÊMICA DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA.

INDICADORES DE PRODUÇÃO

Produção bibliográfica

| | |
|---|----|
| Artigos completos publicado em periódico..... | 22 |
| Comunicações em anais de congressos e periódicos..... | 67 |

Produção técnica

| | |
|---------------------------------------|---|
| Trabalhos técnicos (consultoria)..... | 1 |
|---------------------------------------|---|

Orientações

| | |
|--|----|
| Orientação concluída (iniciação científica)..... | 6 |
| Eventos | |
| Participações em eventos (congresso)..... | 4 |
| Participações em eventos (seminário)..... | 2 |
| Participações em eventos (simpósio)..... | 1 |
| Participações em eventos (encontro)..... | 4 |
| Participações em eventos (outra)..... | 11 |