

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

**CLASSIFICAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA AVIÁRIA (APEC)  
E DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÊNICA (UPEC) EM GRUPOS  
FILOGENÉTICOS ASSOCIADOS COM A PATOGENICIDADE**

**Tese de doutorado**

**Sílvia Luís da Silveira Rocha**

**PORTO ALEGRE**

**2017**

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

**CLASSIFICAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA AVIÁRIA (APEC)  
E DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÊNICA (UPEC) EM GRUPOS  
FILOGENÉTICOS ASSOCIADOS COM A PATOGENICIDADE**

**Autor: Sílvio Luís da Silveira Rocha**

**Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Doutor em Ciências  
Veterinárias na área de Medicina Veterinária  
Preventiva, especialidade de Sanidade Avícola**

**Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento**

**PORTO ALEGRE**

**2017**

## CIP - Catalogação na Publicação

da Silveira Rocha, Sílvio Luís

Classificação de Escherichia coli patogênica aviária (APEC) e de Escherichia coli uropatogênica (UPEC) em grupos filogenéticos associados com a patogenicidade / Sílvio Luís da Silveira Rocha. -- 2017.

86 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

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

1. Avicultura. 2. APEC. 3. UPEC. 4. Patogenicidade. 5. Grupos Filogenéticos. I. Pinheiro do Nascimento, Vladimir, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sílvio Luís da Silveira Rocha

CLASSIFICAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA AVIÁRIA (APEC) E  
DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÊNICA (UPEC) EM GRUPOS  
FILOGENÉTICOS ASSOCIADOS COM A PATOGENICIDADE

Aprovada em 29 MAR 2017

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Luiz César Bello Fallavena  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Lucas Brunelli de Moraes  
Membro da Comissão

## **AGRADECIMENTOS**

Meus agradecimentos iniciam com a equipe atual e as várias gerações de pós-graduandos e estagiários que fizeram parte do CDPA durante esses 26 anos em que estou na UFRGS. Pessoas que fizeram, e algumas ainda fazem parte da minha vida profissional ou pessoal e que marcaram positivamente essa passagem.

Aos colegas Luiz Henrique Carbone Ribas, Gabriela Chitolina e Omar de Oliveira pela amizade e companheirismo durante todo esse tempo. Vocês são importantes.

Venho agradecer muito especialmente aos Professores Carlos Tadeu Pippi Salle e Hamilton Luiz de Souza Moraes, que me receberam em 1991 e me proporcionaram um crescimento em todos os sentidos profissionais durante todos esses anos.

Ao Professor e meu orientador Vladimir Pinheiro do Nascimento pela confiança, oportunidade e orientações.

Aos veterinários Thales Quedi Furian e Karen Apellanis Borges Furian que, além da inteligência e conhecimentos, pude usufruir das suas amizades.

Mas, o mais importante para mim foi a demonstração de carinho, compreensão, entendimento de situações, conselhos, paciência, o lado humano e o companheirismo que recebi e continuo recebendo com relação a problemas particulares. Tadeu, Hamilton, Thales e Karen, eu gostaria de agradecê-los profundamente por tudo que fizeram e serei eternamente grato pelo resto da minha vida. Que Deus esteja com vocês agora e sempre. Muito obrigado.

## RESUMO

A bactéria *Escherichia coli* é responsável por perdas econômicas significativas mundialmente, incluindo-se aquelas que ocorrem na produção avícola. O controle e a prevenção da colibacilose aviária são complexos, pois envolve a distinção de isolados que comumente habitam o trato gastrointestinal das aves daquelas consideradas patogênicas. Embora tenha sido assumido que a maioria dos isolados não possui potencial zoonótico, estudos recentes têm sugerido que isolados isoladas de humanos e de aves poderiam compartilhar o maquinário genético necessário para causar a doença no hospedeiro. Desta forma, os animais de produção poderiam atuar como reservatórios de estirpes potencialmente patogênicas para humanos. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular em grupos filogenéticos de *E. coli* isoladas de aves (APEC) e de humanos (UPEC) e propor um futuro acompanhamento da flutuação da patogenicidade dos isolados APEC em planteis avícolas. Foram selecionadas 450 isolados UPEC e 460 APEC para classificação em quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D) através de um protocolo de multiplex-PCR. Estes resultados foram comparados com a presença ou ausência de 38 genes associados à virulência e com o índice de patogenicidade *in vivo* estabelecido para cada isolado em estudo anterior. Em relação aos isolados APEC, 31,1% foram classificadas no grupo D, 25,2% no grupo B2, 24,1% no grupo B1 e 19,6% no grupo A. Entre os isolados UPEC, 53,6% das foram classificadas no grupo B2, 25,3% no grupo D, 15,1% no grupo A e apenas 6,0% no grupo B1. Os isolados virulentos geralmente classificam-se no grupo B2, porém algumas podem ser classificadas no grupo D. Enquanto que os isolados comensais em geral pertencem aos grupos A e B1. Observou-se associação entre determinados genes e os grupos filogenéticos, tanto para isolados APEC quanto UPEC. Observou-se diferença significativa entre os índices de patogenicidade conforme a fonte de isolamento, sendo que os isolados de lesões apresentaram os maiores índices. Também foi observada uma associação direta entre os índices de patogenicidade obtidos *in vivo* e os grupos filogenéticos. Os isolados do grupo B2 e D apresentaram maiores índices em relação aos isolados B1 e A. Uma vez que a distribuição dos isolados APEC nos grupos filogenéticos apresentou associação significativa com a patogenicidade, o multiplex-PCR torna-se uma importante ferramenta disponível para o *screening* da patogenicidade das amostras isoladas na cadeia avícola.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, APEC, UPEC, patogenicidade, grupo filogenético.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is responsible for significant economic losses, including those occurring in poultry production. The control and prevention of avian colibacillosis are complex because it involves the distinction of pathogenic strains and those that are commonly found in the gastrointestinal tract flora of health birds. Although it has been assumed that most strains do not have zoonotic potential, recent studies have suggested that strains isolated from humans and poultry could share the genetic machinery needed to cause the disease in the host. Therefore, production animals could act as reservoirs of strains potentially pathogenic to humans. The aim of this study was to carry out the molecular characterization in phylogenetic groups of strains of *E. coli* isolated from poultry (APEC) and humans (UPEC), and to propose a future monitoring of the pathogenicity of APEC strains in poultry farms. A total of 450 UPEC and 460 APEC strains were selected for classification into four phylogenetic groups (A, B1, B2 and D) using a multiplex-PCR protocol. These results were compared with the presence or absence of 38 virulence-associated genes and the *in vivo* pathogenicity index established for each strain in a previous study. Regarding the APEC strains, 31.1% were classified in group D, 25.2% in group B2, 24.1% in group B1 and 19.6% in group A. Among the UPEC strains, 53.6% were classified in group B2, 25.3% in group D, 15.1% in group A and only 6.0% in group B1. Virulent strains are generally classified in group B2, but some may be classified in group D. While commensal isolates generally belong to groups A or B1. It was observed an association between certain genes and phylogenetic groups, both for APEC and UPEC strains. A significant difference was observed among pathogenicity indices according to the source of isolation, and the strains isolated from lesions presented the highest indices. A direct association between pathogenicity indices obtained *in vivo* and phylogenetic groups was also observed. Strains of groups B2 and D showed higher indices compared to strains from B1 and A. Since the distribution of APEC strains in phylogenetic groups showed a significant association with pathogenicity, multiplex-PCR becomes an important tool available for screening pathogenicity of the isolated samples in the poultry chain.

**Key words:** *Escherichia coli*, APEC, UPEC, pathogenicity, phylogenetic groups.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Esquema de classificação para determinação do grupo filogenético de *Escherichia coli* através dos resultados de amplificação por PCR dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA *TSPE4.C2*..... 36
- Figura 2 -** Foto de gel de agarose a 1,5% demonstrando os quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) de *Escherichia coli* obtidos através da técnica de multiplex-PCR..... 40



## LISTA DE GRÁFICOS

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Gráfico 1 -</b> | Associação do índice de patogenicidade (IP) com a origem dos isolamentos das 460 cepas de <i>Escherichia coli</i> APEC.....   | 48 |
| <b>Gráfico 2 -</b> | Associação dos quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) observados com a média dos índices de patogenicidade (IP) para os 460 isolados de <i>Escherichia coli</i> APEC..... | 49 |

## LISTA DE TABELAS

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Tabela 1 -</b> | Sequência dos <i>primers</i> , tamanho de fragmentos de amplificação e referência bibliográfica dos genes pesquisados para determinação dos grupos filogenéticos...  | 37 |
| <b>Tabela 2 -</b> | Distribuição dos quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) observados nos 460 isolados de <i>Escherichia coli</i> APEC e 450 isolados de <i>Escherichia coli</i> UPEC obtidos através da técnica multiplex-PCR..... | 41 |
| <b>Tabela 3 -</b> | Frequências absoluta e relativa (%) da presença dos genes de virulência conforme o patotipo dos isolados de <i>Escherichia coli</i> .....  | 44 |
| <b>Tabela 4 -</b> | Frequência relativa dos 38 genes de virulência pesquisados para cada grupo filogenético (A, B1, B2 e D) entre os isolados APEC e UPEC.....   | 46 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|           |  |
|-----------|--|
| APEC      | <i>Escherichia coli</i> patogênica aviária                     |
| BHA       | <i>Brain-Heart Agar</i>  |
| BHI       | <i>Brain Heart Infusion Broth</i>                              |
| CDPA      | Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária          |
| COL       | colicina   |
| COLV      | colicina V   |
| DNA       | <i>Deoxyribonucleic Acid</i>                                   |
| dNTP      | Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado                            |
| ECOR      | Coleção de referência de <i>Escherichia coli</i>               |
| EMB       | <i>Eosin Methylene Blue</i> ágar                               |
| DAEC      | <i>Escherichia coli</i> difusamente aderente                   |
| DEC       | <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica                         |
| EAC       | <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa                       |
| EIEC      | <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva                         |
| EPEC      | <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica                       |
| ETEC      | <i>Escherichia. coli</i> enterotoxigênica                      |
| ExPEC     | <i>Escherichia. coli</i> extra-intestinal                      |
| HCPA      | Hospital de Clínicas de Porto Alegre                           |
| IP        | Índice de Patogenicidade                                       |
| LPS       | Lipopolissacarídeo   |
| mL        | Mililitro  |
| mM        | Milimolar  |
| min       | Minuto   |
| MLEE      | <i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>                       |
| MLST      | <i>Multi Locus Sequence Typing</i>                             |
| m-PCR     | Reação multiplex em cadeia pela polimerase                     |
| PFGE      | <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>                        |
| NMEC      | <i>Escherichia coli</i> associada à meningite do recém-nascido |
| PAI       | Ilhas de Patogenicidade  |
| RFLP      | <i>Restriction fragment length polymorphism</i>                |
| STEC/EHEC | <i>Escherichia coli</i> produtora de Shiga toxina              |

|       |  |
|-------|--|
| STX   | Enterotoxinas e verotoxinas conhecidas como Shiga-toxina |
| UFC   | Unidades Formadoras de Colônias                          |
| UPEC  | <i>Escherichia coli</i> uropatogênica                    |
| UTI   | Infecções do Trato Urinário                              |
| VETEC | <i>Escherichia coli</i> verotoxigênica                   |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                 |                     |
|-----------------|---------------------|
| %               | Percentual          |
| $\chi^2$        | Qui-Quadrado        |
| °C              | Graus Celsius       |
| mL              | Mililitros          |
| $\mu\text{L}$   | Microlitro          |
| $\text{MgCl}_2$ | Cloreto de Magnésio |
| U               | Unidade             |

## SUMÁRIO

|            |   |    |
|------------|---|----|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 15 |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVOS</b> .....  | 17 |
| <b>2.1</b> | <b>Objetivo Geral</b> .....                                     | 17 |
| <b>2.2</b> | <b>Objetivos Específicos</b> .....                              | 17 |
| <b>3</b>   | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....                              | 18 |
| <b>3.1</b> | <i>Escherichia coli</i> .....                                   | 18 |
| 3.1.1      | Características morfológicas e bioquímicas.....                 | 18 |
| 3.1.2      | Classificação.....  | 18 |
| <b>3.2</b> | <b>Patotipos de <i>Escherichia coli</i></b> .....               | 19 |
| 3.2.1      | <i>Escherichia coli</i> patogênica aviária (APEC).....          | 20 |
| 3.2.2      | <i>Escherichia coli</i> uropatogênica (UPEC).....               | 20 |
| <b>3.3</b> | <b>Patogenia</b> .....  | 21 |
| 3.3.1      | Infecção nas aves.....  | 21 |
| 3.3.2      | Infecção no homem.....  | 22 |
| <b>3.4</b> | <b>Colibacilose Aviária</b> .....                               | 23 |
| <b>3.5</b> | <b><i>Escherichia coli</i> e saúde pública</b> .....            | 24 |
| <b>3.6</b> | <b>Patogenicidade e virulência</b> .....                        | 26 |
| 3.6.1      | Elementos móveis.....   | 26 |
| 3.6.2      | Fatores de virulência.....                                      | 27 |
| 3.6.2.1    | Adesinas.....   | 28 |
| 3.6.2.2    | Fímbrias curli.....   | 28 |
| 3.6.2.3    | Hemaglutinina sensível à temperatura.....                       | 29 |
| 3.6.2.4    | Sistemas de aquisição de ferro.....                             | 29 |
| 3.6.2.5    | Colicinas.....  | 29 |
| 3.6.2.6    | Cápsula.....  | 30 |
| 3.6.2.7    | Resistência ao soro complemento.....                            | 30 |
| 3.6.2.8    | Toxinas.....  | 30 |
| 3.6.2.9    | Outros fatores de virulência.....                               | 30 |
| <b>3.7</b> | <b>Grupos filogenéticos de <i>Escherichia coli</i></b> .....    | 31 |
| <b>3.8</b> | <b>Estudos sobre <i>E. coli</i> desenvolvidos no CDPA</b> ..... | 33 |
| <b>4</b>   | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                                | 35 |
| <b>4.1</b> | <b>Amostras bacterianas</b> .....                               | 35 |
| <b>4.2</b> | <b>Extração do DNA</b> .....                                    | 35 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 4.3 | <b>Classificação das amostras em grupos filogenéticos através de multiplex-PCR.....</b> | 36 |
| 4.4 | <b>Associação dos grupos filogenéticos com os índices de patogenicidade.....</b>        | 38 |
| 4.5 | <b>Associação dos grupos filogenéticos com a pesquisa de genes de virulência.....</b>   | 38 |
| 4.6 | <b>Análises Estatísticas.....</b>   | 38 |
| 5   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | 40 |
| 6   | <b>CONCLUSÕES.....</b>  | 51 |
|     | <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | 52 |

## 1 INTRODUÇÃO

A produção brasileira de frango é um importante fator de desenvolvimento econômico para o país. Conforme os dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (2016), a produção brasileira de carne de frango em 2015 foi de aproximadamente 13,140 milhões de toneladas. Com esta produção, o Brasil supera a China e se torna o segundo maior produtor mundial de frango, atrás apenas dos Estados Unidos. A Região Sul do Brasil é responsável por cerca de 63% da produção nacional, sendo o Rio Grande do Sul o terceiro maior produtor de carne de frango do país. Estima-se que a exportação do produto brasileiro atingiu o patamar de 4.304,1 milhões de toneladas em 2015, representando um aumento de cerca de 5% em relação a 2014. Desta forma, o Brasil permanece como o maior exportador mundial. O consumo per capita no Brasil em 2015 foi de 43,25Kg/habitante/ano.

Para a manutenção destes altos índices de produção, é essencial a manutenção da saúde dos plantéis avícolas. Entretanto, a expansão da avicultura industrial e o consequente aumento do número e da concentração de aves favorece a propagação de microrganismos patogênicos. Por muitos anos a *Escherichia coli* foi deixada em segundo plano devido ao surgimento de outros microrganismos emergentes. Entretanto, nos últimos anos tem ocorrido um aumento dos trabalhos envolvendo este patógeno.

A colibacilose é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em aves e é responsável por perdas econômicas significativas no mundo todo. Entretanto, o controle e a prevenção da doença são muito difíceis, pois não existe um método confiável que diferencie as cepas patogênicas, capazes de causar doenças, daquelas que habitam o trato gastrointestinal sem acarretar prejuízos.

Estudos recentes têm sugerido que cepas isoladas de humanos e de aves podem enfrentar desafios semelhantes para o estabelecimento da infecção em locais extra intestinais, o que poderia levar ao compartilhamento do maquinário genético necessário para causar a doença. Alguns estudos demonstram que, embora tenha sido amplamente assumido que a maioria dos isolados não possui potencial zoonótico, em algumas linhagens de *E. coli* aviária seus plasmídeos podem ser transmitidos para hospedeiros humanos.

O avanço das técnicas de biologia molecular, particularmente o sequenciamento genético e as análises filogenéticas, evidenciaram a similaridade genética entre isolados



de humanos e de animais, sugerindo uma origem ancestral comum. Este fato fez surgir hipóteses de que os animais de produção pudessem atuar como reservatórios de estirpes potencialmente patogênicas para humanos, reforçando a ideia de que as doenças causadas por estirpes patogênicas seriam zoonoses. Alguns trabalhos já compararam isolados de origem aviária com aquelas isoladas de infecções do trato urinário em humanos e observaram similaridades quanto aos sorogrupos, aos grupos filogenéticos, aos genótipos de virulência e à capacidade de causar doenças em determinados modelos animais.

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular de isolados de *Escherichia coli* de aves (APEC) e de humanos (UPEC) e propor um futuro acompanhamento da flutuação da patogenicidade das cepas APEC em planteis avícolas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Caracterização molecular de isolados de *Escherichia coli* de origem aviária (APEC) e humana (UPEC).

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Classificar os isolados APEC e UPEC em grupos filogenéticos a partir do desenvolvimento de um protocolo de multiplex-PCR.
- Determinar se existe associação entre os grupos filogenéticos, os genes de virulência e a origem de isolamento dos isolados.
- Realizar a associação dos grupos filogenéticos das cepas APEC determinados através de multiplex-PCR com os índices de patogenicidade obtidos a partir da inoculação *in vivo*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Escherichia coli*

##### 3.1.1 Características morfológicas e bioquímicas

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Escherichia* compreende as espécies *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* e *E. vulneris*. *E. coli* foi descrita pela primeira vez em 1885 por Theodor von Escherich. Esta bactéria é amplamente distribuída no ambiente e no trato digestivo de animais e humanos. É um bastonete curto, Gram negativo, aeróbio ou anaeróbio facultativo e não formador de esporos. Estas bactérias em geral são móveis pela presença de flagelos peritríquios. A temperatura para ótimo crescimento é de 37°C, mas cresce bem entre 18°C e 44°C. Os isolados desta espécie são catalase positiva e oxidase negativa, produz ácido e gás após a fermentação da glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramnose, sorbitol e arabinose. A fermentação de adonitol, sacarose, salicina, rafinose, lactose, ornitina, dulcitol e arginina são variáveis. A produção de indol é positiva e a hidrólise de ureia e a fermentação do citrato são negativas. Estas bactérias produzem reação de vermelho de metila positiva e de Voges Proskauer negativa (FERREIRA; KNÖBL, 2000).

##### 3.1.2 Classificação

As *E. coli* podem ser classificadas através do esquema de sorotipificação proposto por Kauffman em 1947. A identificação sorológica baseia-se em seus principais antígenos de superfície: antígenos O (somáticos), antígenos K (capsulares), antígenos H (flagelares) e antígenos F (fimbriais) (BARNES *et al.*, 2008). O antígeno somático O corresponde a uma das frações do maior componente da parede celular das bactérias Gram negativas, o lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é um elemento termo resistente composto de três frações: antígeno somático, lipídeo A (endotoxina) e core (FERREIRA; KNÖBL, 2009). De natureza proteica, os antígenos flagelares H são eliminados a uma temperatura de 100°C (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Já os antígenos capsulares K são polissacarídeos relacionados à resistência bacteriana perante o sistema complemento. Os antígenos fimbriais F, conhecidos como adesinas, pili ou fímbrias, recobrem a superfície bacteriana e reconhecem receptores específicos na

superfície de células eucarióticas. A expressão de adesinas é considerada como fator determinante para aderência e colonização dos tecidos do hospedeiro (ALMEIDA, 2013).

Atualmente são descritos 177 antígenos somáticos, 100 antígenos capsulares e 52 antígenos flagelares (FERREIRA; KNÖBL, 2000). Na maioria dos esquemas de tipificação apenas os antígenos O e H são determinados, definindo o sorogrupo e o sorotipo respectivamente (BARNES *et al.*, 2008). Embora *E. coli* possua mais de 100 sorotipos, o predomínio de alguns antígenos O (O1, O2, O4, S6, S7, O8, O16, O18) e K (K1, K2, K12) entre os isolados que causam infecções extra intestinais em adultos e crianças sugere que estas estirpes têm uma distribuição oligoclonal.

### **3.2 Patotipos de *Escherichia coli***

A maioria dos isolados de *E. coli* pertencem à microbiota intestinal, tanto de seres humanos quanto de animais. No entanto, aproximadamente, 10% são patogênicas, podendo causar infecções intestinais e extra intestinais (JOHNSON; RUSSO, 2005). Isolados de origem intestinal são genericamente denominados de *E. coli* diarreio gênica (DEC) e podem ser divididos em patotipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Além daqueles causadores de diarreia, outros isolados são importantes causadores de doenças, como *E. coli* verotoxigênica (VETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC/EHEC) e *E. coli* extra-intestinal (ExPEC). Entre as ExPEC estão as *E. coli* patogênica aviária (APEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* associada à meningite do recém-nascido (NMEC) (FERREIRA; KNÖBL, 2000; RUSSO; JOHNSON, 2000; BARNES *et al.*, 2003).

Dadas as doenças causadas por colibacilose e a grande diversidade de estirpes que causam doença, deve-se considerar a doença não como o resultado de um único patotipo, mas sim de uma consequência do aumento da susceptibilidade do hospedeiro devido ao estresse, imunossupressão, co-infecção, ou mal-estar oriundo de um mau manejo. Isto leva a mais infecções oportunistas, em vez do resultado de infecção com um patotipo específico (COLLINGWOOD *et al.*, 2014).

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

As práticas de produção de aves modernas são intensivas e proporcionam condições para o surgimento e propagação de doenças infecciosas. Nesse contexto *E. coli* patogênica das aves (APEC) está associada a diversas doenças, principalmente extra intestinal, sendo responsável por grandes perdas na indústria aviária (NAKAZATO *et al.*, 2009). Como parte do trato intestinal das aves, isolados APEC podem invadir diferentes tecidos, resultando em sintomas sistêmicos. A ocorrência de doença está relacionada com a presença de fatores de virulência por *E. coli*. Estes fatores, codificados por genes específicos, permitem a adesão e a proliferação bacteriana no organismo hospedeiro. APEC está em grande quantidade no ambiente de produção, sendo possível encontrar  $10^9$  UFC/g de fezes nos aviários e  $10^6$  UFC/g na poeira, tornando praticamente impossível a eliminação deste agente no ambiente (FERREIRA; KNOBL, 2009).

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

Infecções do trato urinário (UTI) são as doenças urológicas mais comuns, sendo a *E. coli* o agente mais etiológico nos casos de cistite não complicada e pielonefrite aguda. Infecções por isolados de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) são responsáveis por mais de 80% dos casos de UTI não complicadas, ocorrendo em indivíduos saudáveis, especialmente do sexo feminino devido à anatomia do trato urinário destas pacientes. Aproximadamente 75% dos isolados de *E. coli* extra intestinal (ExPEC) associados com cistite e pielonefrite aguda pertencem a seis sorogrupos, sendo diferentes daqueles isolados de fezes (MOBLEY, 2015). Apesar de parte das infecções do trato urinário ser ocasionadas por isolados com a mesma origem clonal, não existe um perfil fenotípico único (KAPER *et al.*, 2004). Em alguns casos, a disseminação de um único grupo clonal de isolados de UPEC pode ocorrer dentro de uma comunidade através de alimentos contaminados (MANGES *et al.*, 2001).

As cepas UPEC possuem fatores de virulência especializados, permitindo-lhes colonizar e invadir as células, evadir os mecanismos de defesa, lesionar os tecidos e estimular uma resposta inflamatória nociva ao hospedeiro. Entre estes fatores estão um grande repertório de adesinas que UPEC permite a adesão das bactérias às superfícies celulares.

### 3.3 Patogenia

#### 3.3.1 Infecção nas aves

A infecção primária por *E. coli* em geral está associada com falhas de manejo, como excesso de amônia no galpão, alta densidade populacional, oscilações de temperatura, problemas na cama, ventilação deficiente, entre outros (DE CARLI, *et al.*, 2015). Quando estas falhas levam ao aparecimento de soluções de continuidade, pode ocorrer a infecção por cepas patogênicas de *E. coli*. Da mesma forma, problemas de estresse podem debilitar as aves e favorecer a multiplicação do microrganismo, alterando o equilíbrio bactéria/hospedeiro, levando ao aparecimento de doença, especialmente em pintinhos. Em frangos de corte, linhagens APEC também estão associadas com a ocorrência de celulite, que é caracterizada por uma dermatite na região do abdômen e nas coxas. As lesões associadas com celulite também causam perdas na indústria aviária devido à condenação de carcaças (NAKAZATO *et al.*, 2009).

*E. coli* também pode atuar como um patógeno oportunista ou secundário quando em associação com outros agentes infecciosos que provoquem lesão no trato respiratório superior, como o vírus da Doença de Newcastle, vírus da Bronquite Infecciosa ou cepas de *Mycoplasma gallisepticum*. Estas infecções primárias contribuem para o desenvolvimento da colibacilose nas aves através da diminuição da ação das barreiras das vias respiratórias superiores, bem como a exposição à poeira e amônia que também favorecem a infecção, podendo levar a morte ou deixar as aves com implicações como panoftalmia, osteoartrite, sinovite e coligranuloma entre outras.

Pneumovirose pode favorecer a invasão dos tecidos da pele subcutânea por cepas de *E. coli*, levando à ocorrência da síndrome da cabeça inchada. Esta síndrome está associada com a presença de edema na cabeça, pele e tecidos peri-orbitais, exsudatos fibrinosos na cabeça, tecidos subcutâneos e nas glândulas lacrimais (NAKAZATO *et al.*, 2009).

A infecção por *E. coli* geralmente se inicia no trato respiratório por inalação de aerossóis contendo a bactéria, podendo atingir a corrente sanguínea e os órgãos do sistema imunológico, causando septicemia, pericardite, e mortalidade (FERREIRA; KNÖBL, 2000). Na maioria das vezes a infecção é leve, levando ao aparecimento de diarreia fétida, amarelada e pastosa. Entretanto, na forma mais aguda, a infecção pode

ter uma evolução extremamente rápida, atingindo vários órgãos concomitantemente e podendo levar a morte muito rapidamente.

### 3.3.2 Infecção no homem

O trato urinário do homem possui uma série de mecanismos de defesa contra a colonização bacteriana (BIEN *et al.*, 2011). Entretanto, alguns fatores podem favorecer a ocorrência de infecções urinárias. Entre estes fatores estão as condições anatômicas, sendo a infecção mais comum em pessoas com a uretra menor, como as mulheres, a utilização de espermicidas, a baixa quantidade de estrogênios na menopausa, a presença de cálculo renal ou aumento da próstata (MD SAÚDE, 2016). A maior parte das bactérias que causam infecções do trato urinário faz parte da flora intestinal do hospedeiro e invadem a bexiga através da uretra. A adesão bacteriana nas células uropiteliais é fundamental para o estabelecimento das UTIs.

Existem quatro tipos de infecção urinária: cistite (infecção na bexiga), uretrite (infecção na uretra), pielonefrite (infecção nos rins) e infecção nos ureteres. A cistite ou infecção urinária baixa pode ser complicada ou não complicada. Em geral os casos mais graves ocorrem em pacientes imunodeprimidos, que utilizam cateteres em hospitalizações e que possuam condições anatômicas obstrutivas. Infecção urinária não tratada podem causar complicações mais graves, como danos permanentes nos rins, infecção sistêmica, especialmente em crianças, idosos e pacientes imunodeprimidos. Além disto, infecções mais graves em gestantes aumentam o risco de nascimento de bebês abaixo do peso normal ou prematuros (WILES *et al.*, 2008; MD SAÚDE, 2016).

As UPEC movem-se a partir do trato intestinal para estabelecer uma infecção no trato urinário, onde usa peptídeos e aminoácidos como fonte de carbono primária para a aptidão. A capacidade de os microrganismos passarem da uretra para a bexiga e rins reflete os diferentes mecanismos de tropismo de *E. coli*. Vários fatores de virulência altamente regulados estão envolvidos, incluindo pili, toxinas, diversos sistemas de aquisição de ferro e uma cápsula de polissacarídeo. A entrada no trato urinário é seguida por adesão ao uroepitélio. Esta ligação é mediada pela adesina fimbrial H. Uma vez internalizadas, as UPEC podem rapidamente replicar e formar complexos biofilmes denominados comunidades bacterianas intracelulares. Estas comunidades servem como ambiente de proteção transitório (TIBA *et al.*, 2008).

Bien *et al.*(2011) descrevem que a presença de bactérias dentro do trato urinário desencadeia tanto a resposta imune inata como a adaptativa do hospedeiro. Nesta resposta ao estímulo do sistema imune ocorre a produção de uma série de mediadores pré-inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas. Células epiteliais da bexiga e dos rins são uma das principais fontes de interleucina-6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8), importantes no desenvolvimento de danos no tecido local. IL-6 possui uma variedade de funções pró-inflamatória, incluindo ativação de sinais envolvidos no recrutamento de neutrófilos. A hemolisina pode danificar o epitélio unindo-se a outros produtos bacterianos, tais como o LPS, que conduz a uma reação inflamatória aguda. A hemolisina também pode induzir oscilações de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) nas células do epitélio renal aumentando a produção de IL-6 e IL-8. A inflamação ocorre após a adesão ao uroepitélio.

Fímbrias do tipo 1 são responsáveis pela cistite e são expressas continuamente, deixando a infecção restrita à bexiga. No caso das pielonefrites, a expressão desta fímbria é menor, o que libera a bactéria e permite que o microrganismo ascenda através dos ureteres para os rins, onde é anexado através de fímbrias P em receptores de células expressos no epitélio renal (KAPER *et al.*, 2004).

### 3.4 Colibacilose Aviária

O termo colibacilose se refere às infecções localizadas ou sistêmicas causadas total ou parcialmente por *E. coli*, estando associado com grandes prejuízos econômicos por condenação de carcaças ao abate, aumento da mortalidade embrionária, piora da conversão alimentar e menor desenvolvimento corpóreo, além dos custos com medicamentos (BARNES; GROSS, 1997). A colibacilose aviária engloba uma série de quadros clínicos e lesões, incluindo colisepticemia, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, aerossaculite, pericardite, celulite, coligranuloma, doença respiratória crônica complicada, onfalite, salpingite, panoftalmia, osteomielite, onfalite e sinovite (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Uma das doenças mais relevantes causados por ExPEC em animais é colibacilose sistêmica levando a perdas econômicas significativas na indústria de aves em todo o mundo (Dho-Moulin e Fairbrother, 1999; Ewers *et al.*, 2003). A doença, geralmente encontrada em aves domésticas e selvagens, começa como uma infecção no trato respiratório, que conduz a uma infecção sistêmica de órgãos internos com septicemia finalmente se instalando. Outra forma de infecção é



através de lesões de celulite que é um processo infeccioso agudo, difuso e purulento do tecido subcutâneo frequentemente associado à formação de abscessos que podem atingir a musculatura de frangos e perus. Uma variedade de sorotipos foi identificada entre APEC e doenças humanas em adultos e crianças, incluindo infecções do trato urinário e meningite em recém-nascidos (Johnson e Stell, 2000).

A ocorrência de colibacilose depende do resultado da interação entre a bactéria, o hospedeiro e o meio ambiente. A pressão ambiental resulta na aquisição de fatores de virulência através de recombinações genéticas mediada por elementos genéticos móveis ou através da transferência horizontal de genes, favorecendo o surgimento de linhagens emergentes. A transferência horizontal de genes é fundamental para o processo de evolução bacteriana, pois pode facilitar a adaptação em novos ambientes e permitir a aquisição de fatores de virulência envolvidos diretamente em infecções (DOBRINDT *et al.*, 2004; CROXEN; FINLAY, 2010).

### **3.5 *Escherichia coli* e saúde pública**

Um dos principais agentes de toxinfecções alimentares relacionado com o consumo de alimentos de origem animal é a *E. coli* O157:H7, especialmente em países desenvolvidos. Já nos países em desenvolvimento, a gastroenterite em crianças recém-nascidas é responsável, anualmente, por milhares de mortes (FERREIRA; KNOBL, 2000). A evidência de isolados de *E. coli* potencialmente patogênicos e com capacidade de comprometer a saúde de humanos e de animais, bem como de causar sérios prejuízos econômicos e de saúde pública vem sendo confirmada com o avanço das pesquisas em biologia molecular (CROXEN; FINLAY, 2010).

Normalmente, as linhagens comensais de *E. coli* raramente causam doença, e o microrganismo pode ser naturalmente encontrado no trato gastrointestinal de hospedeiros saudáveis (FOXMAN *et al.*, 2000). Entretanto, os mecanismos pelos quais a *E. coli* consegue permanecer neste local ainda não estão totalmente elucidados. Uma hipótese sugere que *E. coli* pode explorar a sua capacidade de utilizar gluconato no cólon de forma mais eficiente do que outras espécies residentes, permitindo assim que ela ocupe um nicho metabólico altamente específico (KAPER *et al.*, 2004). Normalmente um organismo comensal, a *E. coli* pode se tornar um agente patogênico através de mudanças e adaptações no seu genoma pela aquisição, perdas e ou combinações de elementos genéticos móveis (DOBRINDT *et al.*, 2004).

As infecções do trato urinário causadas por UPEC estão entre as doenças mais comuns no mundo, causando altos índices de morbidade e mortalidade. Estima-se que a cada ano ocorram cerca de 11,3 milhões de casos de UTIs só nos Estados Unidos, gerando um custo anual de 1,6 bilhões de dólares (FOXMAN *et al.*, 2000). Apesar de ser o quadro clínico mais frequente, é importante destacar que as cepas UPEC possuem capacidade de causar uma variedade de outras doenças, não apenas as UTIs (ZHAO *et al.*, 2009).

A semelhança genética entre os patotipos ExPEC de isolados de *E.coli* patogênicas para as aves (APEC) e associadas a infecções do trato urinário (UPEC) tem estimulado o desenvolvimento de numerosos trabalhos de pesquisa que comparam fatores de virulência e expressão de genes específicos (CUNHA *et al.*, 2013). Já foi demonstrado que cepas ExPEC de origem humana compartilham características com aquelas de origem aviária, incluindo alguns fatores associados a virulência como a aerobactina, sistemas de aquisição de ferro, fímbrias, cápsula, invasinas, toxinas e hemolisinas. Se estes patotipos são semelhantes na sua constituição genética, o potencial de APEC para servir como uma fonte de ExPEC humana ou como um reservatório de genes de virulência para ExPEC humana deve ser levado em consideração (DOBRINDT *et al.*, 2001; DOBRINDT *et al.*, 2002; OELSCHLAEGGER *et al.*, 2002b, SORSA *et al.*, 2003). Ewers *et al.* (2007) já demonstraram que as aves comerciais podem servir de veículos ou de reservatórios para amostras ExPEC. Além disto, também observam que cepas APEC são potencialmente reservatórios de genes associados à virulência para cepas UPEC. No entanto, existe pouca informação sobre a comparação da expressão de genes específicos entre UPEC e APEC isolados durante uma infecção *in vivo*, o que é um passo essencial para definir se APEC pode servir como uma fonte de ExPEC humano patogênico ou como um reservatório de genes de virulência para ExPEC humano.

Além disso, alguns isolados aviários, especialmente aquelas que contêm a cápsula K1, têm demonstrado uma relação próxima com clone O18:K1, pertencente ao grupo filogenético B2. Apesar das semelhanças genéticas, a extensão do risco zoonótico associado a APEC necessita de maiores esclarecimentos (MOULIN-SCHOULEUR *et al.*, 2006).

### 3.6 Patogenicidade e virulência

O genoma de um patógeno bacteriano é composto por uma porção conservada, denominada “core”, que contém a informação genética necessária para as funções celulares essenciais, e um *pool* de genes “flexíveis” que codificam características adicionais que podem conferir vantagens aos microrganismos patogênicos. A organização genômica da região do ‘core’ do genoma é similar em espécies intimamente relacionadas. Por outro lado, a região de *pool* de genes “flexíveis” representa regiões cromossômicas variáveis, e incluem acessórios e elementos móveis genéticos, como bacteriófagos, plasmídeos, ilhas de patogenicidade, sequência de inserção, transposons e integrons (HENTSEL; HACKER, 2001).

A diversidade genética e a plasticidade do genoma de *E. coli* são de grande importância, pois representa uma espécie versátil e diversa entre as enterobactérias que compreende não apenas as variantes não patogênicas ou comensais que pertencem a flora intestinal normal da maioria dos mamíferos, mas também estirpes patogênicas responsáveis por diversas infecções intestinais e extra intestinais (TOUZAIN *et al.*, 2010). A frequente aquisição ou perda de informação genética é de grande importância para a evolução adaptativa das bactérias causadoras de doença, assim como a aquisição simultânea de muitos genes por transferência horizontal (GROZDANOV *et al.*, 2004). A evolução de muitas bactérias por transferência horizontal facilita a adaptação em novos ambientes, mas contribui também para a capacidade de aquisição de fatores de virulência envolvidos diretamente em infecções (DORBRINT *et al.*, 2010). A aquisição de novos fatores de virulência por cepas de *E. coli* comensal podem servir como um “sistema de alerta” para o aparecimento de resistência e virulência em bactérias potencialmente patogênicas (ROCHA, 2008).

#### 3.6.1 Elementos móveis

Genes de virulência são frequentemente localizados em elementos genéticos móveis, incluindo as Ilhas Genômicas (GEI). Dependendo das funções que estas ilhas codificam e as vantagens que conferem em relação ao estilo de vida de uma bactéria específica, as GEIs podem ser chamadas de ilhas de patogenicidade, simbiose, aptidão, metabólica, ou de resistência (HACKER, 2000). As ilhas de patogenicidade (PAI) são constituídas por amplas regiões cromossômicas (10.000 a 200.000 pares de bases) de

alta instabilidade e com características distintas do restante do genoma bacteriano, que codificam um ou mais genes de virulência, e parte ou todo arsenal molecular para que esses genes possam alcançar sua célula alvo (HACKER, 2000). As PAIs possuem *hot spots* em suas extremidades, que são elementos envolvidos na mobilidade genética (local de inserção ou deleção genômica), como: fagos temperados, sequências de inserção e integrases (VIEIRA, 2009). Até o momento já foram descritas oito ilhas de patogenicidade para *E. coli*, sendo PAIICFT073 e PAI IICFT073 as principais. A primeira ilha possui um grupo de genes que codificam a  $\alpha$ -hemolisina e a proteína Pap, enquanto que a segunda transporta apenas os genes codificadores da Pap (EUSÉBIO *et al.*, 2016).

Os plasmídeos podem estar presentes conferindo novas características às bactérias que os possuem. Os plasmídeos são bem menores que os cromossomos e são capazes de se duplicar independentemente do cromossoma bacteriano. Transposons são porções lineares, fragmentos de DNA que se move de um sítio para outro no DNA cromossômico ou entre o DNA de bactérias, de plasmídeos e de bacteriófagos. São denominados de "genes saltadores" e não são capazes de se duplicar independentemente. Codificam enzimas relacionadas à resistência a antimicrobianas e podem causar mutações. Os integrons estão localizados no cromossomo ou dentro de elementos de transposição e podem se integrar por recombinação em locais específicos do DNA. Elementos transponíveis, como transposons e integrons, contribuem para a transmissão de fatores de virulência, bem como a resistência aos antibióticos de uma bactéria para outra (DOBRINDT *et al.*, 2004).

### 3.6.2 Fatores de virulência

Genes envolvidos na adesão bacteriana, invasão, produção de toxina, soro sobrevivência e na aquisição de ferro contribuem com a patogenicidade das cepas de *E. coli*. É provável que combinações de genes associados à virulência sejam necessárias para que uma cepa de *E. coli* seja considerada patogênica (JOHNSON; RUSSO, 2005; RODRIGUEZ-SIEK *et al.*, 2005; ANANIAS; YANO, 2008). Já foram descritos mais de 40 fatores de virulência relacionados a *E. coli*, na sua maioria associados à colonização do hospedeiro (adesinas/invasinas), à sobrevivência no ambiente extraintestinal (sistemas de captação de ferro) e ao escape das defesas do hospedeiro (fatores que dificultam a fagocitose ou que promovam resistência ao complemento

presente no soro). Diversos estudos têm demonstrado que raramente são encontrados todos os fatores de virulência em um mesmo isolado, o que significa que linhagens APEC constituem um grupo heterogêneo neste particular. (SCHOULER *et al.*, 2012).

#### 3.6.2.1 Adesinas

A adesão bacteriana aos tecidos epiteliais é considerada como sendo um passo importante para o estabelecimento da infecção por *E. coli*, uma vez que permite a ligação bacteriana e a manutenção em estreito contato com o epitélio dos tecidos. Entre linhagens APEC, fímbrias do tipo 1 estão relacionados com a adesão ao trato respiratório superior, e a adesina fimbrial Pap (*pyelonephritis associated pili* – pili associada à pielonefrite) com o estabelecimento da bactéria em órgãos internos. As Pap estão associadas à pielonefrite aguda não complicada, encontrando-se o receptor específico disseminado nas membranas celulares das células renais, sendo essenciais para a colonização do trato urinário alto. Enquanto a fímbria Tipo 1 auxilia no início da colonização do epitélio respiratório, as fímbrias Pap fazem parte do último estágio da infecção. A adesina fimH, pertencente as fímbrias do tipo 1 e liga-se especificamente à uroplaquina Ia, uma glicoproteína expressa pelas células vesicais (NAKAZATO *et al.*, 2009; EUSÉBIO *et al.*, 2016).

#### 3.6.2.2 Fímbrias curli

As fímbrias curli são apêndices finos encontrados na superfície das células de *Salmonella* spp. e de *E. coli*. Estas fímbrias são responsáveis pela ligação bacteriana a proteínas da matriz extracelular e pela sobrevivência bacteriana no ambiente externo. Fímbrias curli são mais expressas a 26°C, durante o crescimento na fase estacionária e em condições de baixa osmolaridade. Os genes responsáveis pela expressão destas fímbrias são codificados por dois operons: *csgBAC* e *csgDEFG*. O operon *csgDEGF* tem expressão controlada por fatores ambientais, como temperatura, osmolaridade, pH, entre outros (NAKAZATO *et al.*, 2009).

### 3.6.2.3 Hemaglutinina sensível à temperatura

A hemaglutinina sensível à temperatura é uma proteína expressa por linhagens APEC que apresentam atividade hemaglutinante em eritrócitos de galinhas, sendo ativada em temperaturas próximas a 26°C e inativada a 42°C. A TSH é uma proteína autotransportadora de serina-protease que possui duas subunidades, sendo uma proteína bifuncional, com atividades adesiva e proteolítica. O gene codificante de TSH foi encontrado entre 25 e 50% das cepas APEC isoladas a partir de galinhas com septicemia e síndrome da cabeça inchada, respectivamente, e em apenas 6% das cepas comensais (NAKAZATO *et al.*, 2009).

### 3.6.2.4 Sistemas de aquisição de ferro

Linhagens APEC sobrevivem em ambientes com baixa disponibilidade de ferro, principalmente no interior do hospedeiro. Os mecanismos de aquisição de ferro bacteriano incluem a produção de dois tipos de sideróforos que agem como quelantes de íons no hospedeiro: fenolates e hidroxamate. A aerobactina é um sideróforo hidroxamate de *E. coli* e é codificada por um plasmídeo. Já foi demonstrado que linhagens patogênicas de APEC expressam sistemas de captação de ferro, o que não ocorre com cepas não patogênicas. Outros sideróforos já foram descritos para *E. coli*, como o Yersiniabactin (NAKAZATO *et al.*, 2009).

### 3.6.2.5 Colicinas

As colicinas são proteínas expressas por *E. coli* que inibem o crescimento bacteriano. São compostas por duas subunidades: uma que provoca lesões nas células bacterianas e outras que protege a bactéria contra suas próprias colicinas. Estas proteínas são em geral codificadas por genes localizados em plasmídeos, frequentemente chamados de plasmídeos COL. A maioria das linhagens APEC têm colicinas em plasmídeos V, que são conhecidos como COLV. As mutações em plasmídeos COLV têm demonstrado diminuição da virulência, sugerindo que alguns genes ligados a plasmídeos COLV estão envolvidos no estabelecimento da infecção aviária (NAKAZATO *et al.*, 2009).

### 3.6.2.6 Cápsula

Alguns isolados de *E. coli* possuem uma cápsula de ácido murâmico (N-acetil) na sua superfície celular. Esta cápsula interage com a via clássica do sistema complemento do hospedeiro, conferindo resistência à bactéria. O antígeno capsular K1 está frequentemente associado aos isolados APEC pertencente aos sorogrupos O1 e O2 (NAKAZATO *et al.*, 2009).

### 3.6.2.7 Resistência ao soro complemento

A resistência bacteriana ao soro complemento é mediada por estruturas superficiais bacterianas como LPS, proteínas de cápsula, Col V e membrana externa, e têm sido associadas com linhagens APEC. O aumento da sobrevivência de soro está associado à patogenicidade APEC, uma vez que o gene *iss* foi encontrado mais frequentemente entre cepas patogênicas, quando comparado às não patogênicas, apesar do sorotipo, espécies aviárias e origem da lesão (NAKAZATO *et al.*, 2009).

### 3.6.2.8 Toxinas

Algumas linhagens APEC são capazes de produzir toxinas como a temperatura lábil e temperatura estável enterotoxinas e verotoxinas conhecidas como Shiga-toxinas. O gene *stx* já foi identificado em isolados de *E. coli* isoladas a partir de aves com celulite, septicemia e/ou síndrome da cabeça inchada. Também já foi identificada uma toxina vacuolizante codificada pelo gene *vat* (NAKAZATO *et al.*, 2009).

### 3.6.2.9 Outros fatores de virulência

Outros fatores de virulência encontrados entre linhagens APEC incluem ilhas genômicas, ilhas de patogenicidade, elementos móveis, plasmídeos, fagos, sequências de inserção.

### 3.7 Grupos filogenéticos de *Escherichia coli*

Devido a fenômenos evolutivos, vários grupos bacterianos têm se separado dentro das espécies de microrganismos. Este agrupamento pode ser realizado através de técnicas como enzimas multilocus, ribotipagem, MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*) e PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*). Entretanto, estas técnicas são complexas e laboriosas, além de apresentarem limitações (JOHNSON *et al.*, 2001).

Para auxiliar na identificação da origem evolutiva de *E. coli* extra intestinais, uma nova ferramenta tem sido utilizada. Esta ferramenta baseia-se na análise da distribuição dos marcadores de patogenicidade para classificação dos isolados em grupos filogenéticos. A caracterização em grupos filogenéticos é realizada através da detecção de três genes (CLERMONT *et al.*, 2000). Este método é bastante útil na classificação de cepas desconhecidas de *E. coli*, identificando-as como patogênicas ou comensais. O protocolo proposto por Clermont *et al.* (2000) baseia-se na pesquisa dos genes *chuA*, *yjaA* e no fragmento de DNA TSPE4.C2. O gene *chuA* é necessário para o transporte heme em *E. coli* enterohemorrágica O157: H7, enquanto o gene *yjaA*, inicialmente identificado na sequência completa do genoma de *E. coli* K-12, possui função desconhecida. O fragmento de DNA designado como TSPE4.C2, já foi caracterizado como um gene putativo da lipase esterase (GORDON *et al.*, 2008). O gene *chuA* está presente nas cepas dos grupos A e B1, diferenciando-as daquelas dos grupos B2 e D. As cepas dos grupos A e B1 são discriminadas pela presença do fragmento TSPE4.C2, que está presente apenas naqueles pertencentes ao grupo B1. Já o gene *yjaA* permite a discriminação entre os grupo B2 (presente) e grupo D (ausente) (CLERMONT *et al.*, 2000).

As cepas virulentas geralmente classificam-se no grupo B2, porém algumas podem ser classificadas no grupo D. Por outro lado, os isolados comensais pertencem aos grupos A e B1 (CLERMONT *et al.*, 2000; SABATÉ *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009). As diferenças entre *E. coli* patogênicas e comensais estão relacionadas com seus ancestrais filogenéticos. Assim as causas de infecções extra intestinais (ExPEC) incluindo infecções urinárias e as septicemias, derivam, principalmente, do grupo B2 e em menor proporção ao grupo D. Além disto, possuem um grande número de determinantes de virulência que promovem funções patogênicas, tais como aderência, evasão aos mecanismos de defesa do hospedeiro, aquisição de ferro, invasão celular, entre outros. Por outro lado, cepas comensais pertencentes aos grupos A e B1 possuem



poucos determinantes de virulência. Ainda que isolados de *E. coli* pertencentes aos grupos filogenéticos A e B1 façam parte da flora comensal, e sejam consideradas não patogênicas, ocasionalmente tem sido responsáveis por infecções extra intestinais. MORENO *et al.*, 2006).

Estudos recentes têm demonstrado que *E. coli* possui sete grupos filogenéticos bem descritos (A, B1, B2, C, D, E, F), e um oitavo grupo ainda em estudo, denominado clado I (WALK *et al.*, 2009). Desta forma, Clermont *et al.* (2013) propôs alterações no seu protocolo a fim de se obter uma melhoria da especificidade e de permitir a detecção dos novos grupos filogenéticos. Foram mantidos os mesmos genes alvos originais (*chuA*, *yjaA* e *TspE4.C2*), mas as sequências dos *primers* foram alteradas para evitar os polimorfismos na sequência de nucleotídeos utilizados para hibridação do iniciador. Além disso, foi adicionado um novo gene alvo (*arpA*). Este gene atua como um controle interno para a qualidade do DNA, mas também permite a identificação de cepas pertencentes ao grupo filogenético F, anteriormente identificado como grupo D (*ChuA* (+), *yjaA* (-), *TspE4.C2* (-)). O gene *arpA* está presente em todas as cepas *E. coli*, com exceção daquelas pertencentes ao filogrupos B2 e F (CLERMONT *et al.*, 2004; CLERMONT *et al.*, 2013). Para identificar isolados dos grupos C e E, dois novos pares de *primers* foram desenhados (LESCAT *et al.*, 2012). O grupo filogenético F consiste de linhagens que formam um grupo irmão ao grupo B2 (CLERMONT *et al.*, 2011a). Mais recentemente, o grupo C tem sido proposto como um conjunto de isolados estreitamente relacionados, mas distintas do filogrupos B1 (CLERMONT *et al.*, 2011a). Apesar das melhorias propostas por Clermont *et al.* (2013), um pequeno grupo de isolados pode não ser classificado corretamente. É possível que uma pequena fração dos isolados de *E. coli* não possa ser atribuído a nenhum filo grupo. Possivelmente representam filo grupos que são extremamente raros ou são o resultado de eventos de recombinação em grande escala onde o doador e o receptor são originados a partir de dois diferentes filogrupos (TOUCHON *et al.*, 2009).

As cepas dos quatro principais grupos filogenéticos diferem entre si em suas características fenotípicas, incluindo a habilidade na utilização de diferentes açúcares, o perfil de resistência aos antimicrobianos e a temperatura ideal de crescimento. O tamanho do genoma também varia entre os grupos filogenéticos, sendo que cepas dos grupos A e B1 têm o genoma menor do que aquelas dos grupos B2 e D (BERGTHORSSON; OCHMAN, 1998; TENAILLON *et al.*, 2010; ALM *et al.*, 2011). Os isolados também diferem de acordo com seus nichos ecológicos e com a presença de

determinados fatores de virulência. Com isso, isolados dos grupos B2 e D não são frequentemente encontradas em amostras ambientais (WALK *et al.*, 2007). Já isolados de peixes, anfíbios, répteis e as amostras ambientais são geralmente classificadas nos grupos A ou B1 (GORDON; COWLING, 2003).

### **3.8 Estudos sobre *Escherichia coli* desenvolvidos no CDPA**

Os primeiros trabalhos desenvolvidos no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) tiveram como enfoque o desenvolvimento de uma nova ferramenta para a determinação de um índice de patogenicidade (IP) de isolados APEC obtido através da inoculação em pintos de um dia. Esta nova metodologia propõe uma classificação objetiva e com base em resultados numéricos variando de 0 a 10. Esta ferramenta viabiliza a análise dos dados através de tratamento estatístico e permite a comparação de resultados. Esta nova metodologia contempla, além da mortalidade, também o tempo de morte e as lesões apresentadas em cada um dos animais inoculados, o que a torna uma ferramenta mais precisa (SOUZA, 2006; SOUZA *et al.*, 2016).

Os trabalhos seguintes determinaram o perfil genético destes mesmos isolados de *E. coli*. O perfil genético foi determinado através da detecção de 38 genes de virulência pesquisados através da técnica de multiplex-PCR (m-PCR). Os genes selecionados codificam fatores de virulência e estão envolvidos nos mecanismos de patogenicidade de *E. coli*. Entre os genes pesquisados estão àqueles associados com expressão de fímbrias, produção de hemolisinas, aquisição de ferro, resistência ao soro, presença de toxinas, entre outros (TEJKOWSKI, 2008).

A pesquisa de genes de virulência através da PCR não indica, necessariamente, que uma amostra é patogênica ou não, pois um grupo determinado de genes, ou demais características, não expressam fidedignamente seu potencial patogênico. Amostras que apresentam o mesmo grupo de genes, por exemplo, podem ter um perfil distinto. Isso se explica pelo fato de que alguns fatores, tais como hospedeiro, ambiente e estilo de vida da bactéria, influenciam na sua expressão e no seu potencial de virulência. Por esta razão, os pesquisadores do CDPA utilizaram as Redes Neurais Artificiais (RNAs), para associar os resultados da pesquisa destes genes com o índice de patogenicidade obtido *in vivo* (SOUZA, 2006; SOUZA *et al.*, 2016). Com base nos dados obtidos através da análise das cepas APEC, o CDPA, juntamente com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), desenvolveu um projeto de pesquisa similar ao realizado com isolados

APEC, mas com o objetivo de avaliar a patogenicidade de cepas UPEC. A determinação do índice de patogenicidade foi feita através das RNAs, utilizando-se como base os resultados do IP *in vivo* das cepas APEC e a presença dos genes detectados em cepas UPEC (TEJKOWSKI, 2013).

Por ser demorada e trabalhosa, a pesquisa de 38 genes de virulência quase foi inviabilizada na rotina laboratorial recentemente. Além disto, as RNAs desenvolvidas não demonstraram ser adequadas para relacionar a combinação de fatores de virulência com os IPs de aves. Desta forma, a utilização de um tríplex PCR para classificação dos isolados de *E. coli* APEC e UPEC em grupos filogenéticos pode ser uma alternativa interessante para o estudo da patogenicidade deste microrganismo. O protocolo desenvolvido por Clermont *et al.* (2000) é um método simples e rápido que permite realizar a diferenciação entre cepas patogênicas e apatogênicas. Esta diferenciação permite a monitorização e o acompanhamento da flutuação de patogenicidade de cepas de *E. coli*. A classificação em grupos filogenéticos também possibilita que seja traçada a relação entre cepas APEC e UPEC para compreender de forma mais completa estes dois patotipos, especialmente quanto às características de virulência e de filogenia. O estudo destes patotipos possibilita o esclarecimento do verdadeiro potencial zoonótico das cepas APEC, determinando se os produtos de origem animal estão envolvidos na disseminação de genes virulentos das aves para o ser humano.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA/UFRGS).

### 4.1 Amostras bacterianas

Para este estudo, 460 isolados APEC (*Escherichia coli* patogênica aviária) e 450 UPEC (*Escherichia coli* uropatogênica) foram selecionadas. As amostras APEC foram isoladas entre 2002 e 2008, a partir de lesões de celulite, de quadros respiratórios e da cama aviária de lotes de frangos de corte de 60 propriedades integradas a três empresas avícolas da Região Sul do Brasil. Os isolados UPEC foram cedidas pelo laboratório de análises do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e são provenientes de pacientes que apresentavam infecção urinária causada por *E.coli* no ano de 2012. As informações referentes às amostras analisadas estão disponíveis nos APÊNDICES A e B.

Todos os isolados encontravam-se estocadas em caldo infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion Broth* - BHI - Oxoid®) com glicerol, respectivamente, em uma proporção de 4:1, a uma temperatura de -80°C. A reativação e os testes preliminares de confirmação das amostras puras foram realizados de acordo com Lee e Nolan (2008). Os isolados foram reativados em BHI, meio não seletivo de enriquecimento, e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após este período, foi realizada a semeadura por esgotamento em ágar EMB (*Eosin Methylene Blue* - EMB - Oxoid®) e o material foi incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após, as colônias presentes no ágar EMB que apresentavam coloração verde metálica foram avaliadas de acordo com a sua morfologia e selecionadas para a realização dos testes de catalase e de oxidase, para a coloração pelo método de Gram (OLIVEIRA, 2012) e para a realização de testes bioquímicos complementares (LEE; NOLAN, 2008).

### 4.2 Extração do DNA

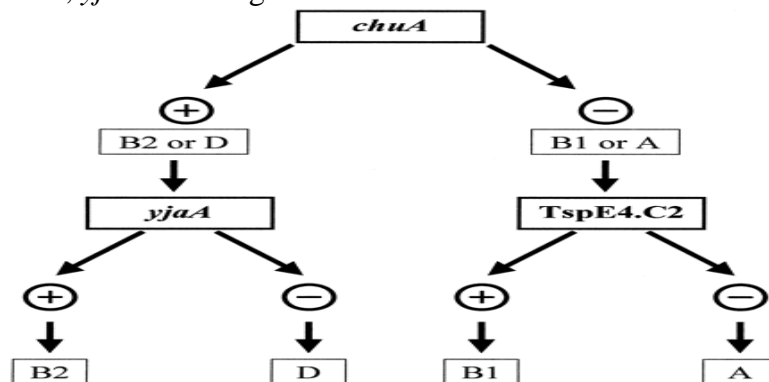
A extração do DNA para a execução dos testes moleculares foi realizada através do método por calor, adaptada a partir da técnica descrita por Clermont *et al.* (2000).

Uma alíquota de 50 µL de cada um dos isolados armazenados em BHI com glicerol foi reativado em caldo BHI, o qual foi incubado por 24 horas a 37°C em estufa bacteriológica. Posteriormente, o caldo cultivado foi semeado por esgotamento em ágar EMB e em ágar BHA (*Brain Heart Infusion Agar* - BHA - Oxoid®). As placas foram novamente incubadas, conforme as condições anteriormente descritas. Entre três a cinco colônias bacterianas isoladas no ágar BHA foram coletadas com uma alça de platina estéril e solubilizadas em um microtubo contendo 200 µL de água ultrapura. Após, a solução foi resfriada a -20°C por 10 minutos e, em seguida, aquecida a 100°C pelo mesmo período em banho-maria com agitação. Por último, a solução foi centrifugada a 14.000 g por 10 minutos e o sobrenadante contendo o DNA foi repassado para um novo microtubo. O material foi armazenado a -20°C até o momento da análise por PCR.

#### 4.3 Classificação das amostras em grupos filogenéticos através de multiplex-PCR

Os isolados APEC e UPEC foram classificadas em quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D) através do esquema de discriminação desenvolvido por Clermont *et al.* (2000), o qual é baseado na detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA *TspE4.C2* através de multiplex-PCR (Figura 1). Pertencem ao grupo A os isolados *chuA* (-), *yjaA* (+/-) e *TSPE4.C2* (-). Os isolados *chuA*(-), *yjaA* (+/-) e *TSPE4.C2* (+) pertencem ao grupo B1 e os isolados *chuA* (+), *yjaA* (+) e *TSPE4.C2* (+/-) são classificados no grupo B2. Os isolados *chuA* (+), *yjaA* (-) e *TSPE4.C2* (+/-) pertencem ao grupo D.

Figura 1 – Esquema de classificação para determinação do grupo filogenético de *Escherichia coli* através dos resultados de amplificação por PCR dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA *TSPE4.C2*.



Fonte: Clermont *et al.* (2000)

O protocolo de multiplex-PCR adotado no estudo foi adaptado a partir da metodologia descrita por Clermont *et al.* (2000). O mix da reação foi composto por 2,5 µL de solução Tampão 10x (50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl [pH 8,3] (Invitrogen®), 2 µL de trifosfatos desoxinucleosídeos (2mM - Invitrogen®), 2 µL de cada primer ou oligonucleotídeo (20 pmol - Invitrogen®), 1,5 U de *GoTaq*® *Hot Start Polymerase* (Invitrogen®), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> (25 mM - Invitrogen®), 5 µL de DNA e água ultrapura para completar um volume final de 25 µL. A sequência dos primers selecionados, o tamanho aguardado dos amplicons e a referência bibliográfica dos genes está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos *primers*, tamanho dos fragmentos de amplificação e referência bibliográfica dos genes pesquisados para determinação dos grupos filogenéticos.

| Genes       | Sequência dos <i>primers</i><br>(5' - 3') | Tamanho do amplicon (pb) | Referência dos <i>primers</i> |
|-------------|---|--------------------------|-------------------------------|
| <i>chuA</i> | F - GACGAACCAACGGTCAGGAT                  | 279                      | Clermont et al 2000           |
|             | R - TGCCGCCAGTACCAAAGACA                  |                          |                               |
| <i>YjaA</i> | F - TGAAGTGTCAGGAGACGCTG                  | 211                      | Clermont et al 2000           |
|             | R - ATGGAGAATGCGTTCCTCAA                  |                          |                               |
| TspE4C2     | F - GAGTAATGTCGGGGCATTCA                  | 152                      | Clermont et al 2000           |
|             | R - CGCGCCAACAAAGTATTACG                  |                          |                               |

Legenda: Reverse (R), Forward (F).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Thermal Cycler 2720 - Applied Biosystems®) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, de anelamento a 55°C por 30 segundos e de extensão a 72°C por 30 segundos; além da extensão final a 72°C por 7 minutos. A eletroforese dos produtos amplificados foi desenvolvida em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. As imagens foram capturadas digitalmente por um sistema de captação (AlphaDigDoc Pro - Alpha Innotech®) e posteriormente interpretadas.

#### 4.4 Associação dos grupos filogenéticos com os índices de patogenicidade

Nesta etapa, os grupos filogenéticos foram associados aos níveis de patogenicidade de cada isolado de *E. coli* do patotipo APEC, obtidos através da inoculação experimental de pintos comerciais com 01 dia de idade (SOUZA, 2006; SOUZA *et al.*, 2016). Neste trabalho prévio, 0,1 mL de um inóculo bacteriano contendo  $10^8$  UFC/mL foi inoculado através da via intraperitoneal e as aves foram avaliadas quanto à presença ou ausência de cinco lesões macroscópicas e quanto ao tempo de morte por um período de 07 dias. Desta forma, as amostras foram classificadas em índices de patogenicidade (IP) em uma escala de 0 a 10 (SOUZA, 2006; SOUZA *et al.*, 2016). O IP de cada amostra de *E. coli* do patotipo APEC está descrito no Apêndice A deste trabalho. Os isolados UPEC oriundos de humanos com infecção urinária não foram inoculados *in vivo*, não possuindo, portanto índices de patogenicidade (IP).

#### 4.5 Associação dos grupos filogenéticos com a pesquisa de genes de virulência

Nesta etapa, a classificação dos isolados de *E. coli* dos patotipos APEC e UPEC em grupos filogenéticos foi associada com a presença de 38 genes associadas à virulência da bactéria. Entre estes, genes responsáveis pela capacidade de adesão (*afa/draB*, *crl*, *fimC*, *fimH*, *hra*, *iha*, *papC*, *papG*, *sfa/focC*, *tsh*, *mat* e *felA*); invasão (*gimB*, *ibeA*, *tia* e *cvaC*), aquisição de ferro (*chuA*, *fyuA*, *ireA*, *ironA*, *irp2*, *iucD*, *sitD/chr*, *sitDep* e *iutA*), resistência sérica (*cvi/cva*, *iss*, *neuC*, *kpsMT II*, *ompA* e *traT*), toxinas (*astA*, *cnf1/2*, *sat*, *vat* e *hlyA*), transporte sérico (*pic*) e com ilhas de patogenicidade (*malX*). A função associada de cada um dos genes de virulência selecionados consta no ANEXO A. A pesquisa destes genes foi previamente realizada através do emprego de protocolos de multiplex-PCR desenvolvidos previamente em nosso laboratório (TEJKOWSKI, 2013).

#### 4.6 Análises estatísticas

A análise de estatística descritiva foi empregada para a determinação da frequência absoluta e relativa das amostras em cada um dos grupos filogenéticos. Os testes não paramétricos do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e o Teste Exato de Fisher foram utilizados para determinar se existe associação dos grupos filogenéticos e da presença individual

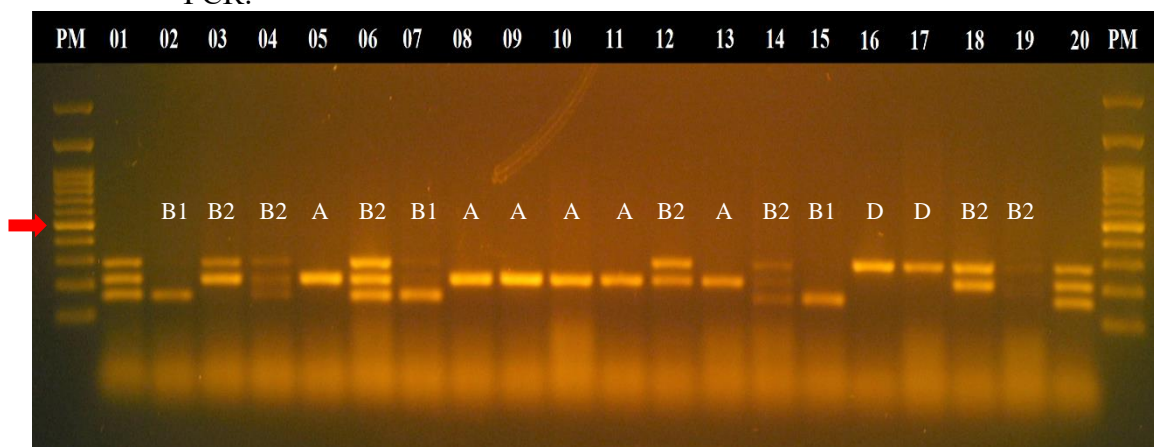
dos 38 genes de virulência selecionados. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação das médias dos índices de patogenicidade das cepas APEC e UPEC conforme o grupo filogenético. O programa PASW foi utilizado para as análises estatísticas, adotando-se como referencial o nível de significância de 5% e o nível de confiança de 95%.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de multiplex-PCR, adaptado no laboratório conforme a metodologia descrita por Clermont *et al.* (2000), foi capaz de diferenciar 100% dos isolados de *E. coli* APEC e UPEC nos quatro grupos filogenéticos propostos (Figura 2). Destaca-se que Clermont *et al.* (2000) compararam os resultados obtidos através do multiplex-PCR com as classificações atribuídas através do método de MLST (*Multi Locus Sequence Typing*), selecionando-se cepas de uma coleção de referência (ECOR) recuperadas a partir de diferentes hospedeiros e habitats. Este estudo de validação demonstrou que entre 80 a 85% das classificações através do multiplex-PCR são consideradas corretas (CLERMONT *et al.*, 2000). Em 2008, Gordon *et al.* (2008) estimaram de forma semelhante que 90% das estirpes de *E. coli* podem ser classificadas em um dos quatro principais grupos filogenéticos através de MLST com sete genes *housekeeping*.

Figura 2 – Foto de gel de agarose a 1,5% demonstrando os quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) de *Escherichia coli* obtidos através da técnica de multiplex-PCR.



Legenda: PM = marcador de peso molecular (100 pb). 01 e 20 = controle positivo *E. coli* ATCC 25922. 05, 08, 09, 10 e 11: grupo filogenético A (*YjaA*). 02, 07 e 15 = grupo filogenético B1 com a presença do marcador molecular (*TspE4C2*). 04, 06 e 14 = grupo filogenético B2 com a presença dos três marcadores moleculares (*chuA*, *YjaA* e *TspE4C2*). 03, 12, 18 e 19: grupo filogenético B2 com a presença de dois marcadores moleculares (*chuA* e *YjaA*). 16 e 17: grupo filogenético D, com a presença de apenas um marcador (*chuA*). Seta indica 500pb.

As frequências relativa e absoluta dos grupos filogenéticos observados nos isolados de *E. coli* APEC e UPEC estão descritos na Tabela 2. Quanto à distribuição dos isolados APEC nos grupos filogenéticos, 31,1% (90/460) foram classificadas no grupo D, 25,2% (111/460) no grupo B2, 24,1% no grupo B1 (116/460) e 19,6% (143/460) no

grupo A. No patotipo UPEC, a frequência relativa foi de 53,6% no grupo B2 (241/450), 25,3% (114/450) no grupo D, 15,1% (68/450) no grupo A e apenas 6,0% (27/450) no grupo B1. A relação completa do grupo filogenético determinado no presente estudo e o índice de patogenicidade descrito por Souza *et al.* (2016) para cada isolado avaliado está descrita nos APÊNDICES A e B.

Tabela 2 – Distribuição dos quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) observados nos 460 isolados de *Escherichia coli* APEC e 450 isolados de *Escherichia coli* UPEC obtidos através da técnica de multiplex-PCR.

| Patotipo | Grupo Filogenético | Frequência absoluta (n) | Frequência relativa (%) |
|----------|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| APEC     | A                  | 90                      | 19,6                    |
|          | B1                 | 111                     | 24,1                    |
|          | B2                 | 116                     | 25,2                    |
|          | D                  | 143                     | 31,1                    |
| UPEC     | A                  | 68                      | 15,1                    |
|          | B1                 | 27                      | 6,0                     |
|          | B2                 | 241                     | 53,6                    |
|          | D                  | 114                     | 25,3                    |

A classificação majoritária dos isolados UPEC constatada no atual estudo no grupo B2 é ratificada em diferentes pesquisas citadas na literatura (EWERS *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2009). Por exemplo, Rodrigues-Siek *et al.* (2005) classificaram 65% dos isolados UPEC provenientes de pacientes internados na UTI (Unidade de Terapia Intensiva) no mesmo grupo. Cepas virulentas geralmente classificam-se no grupo B2, apesar de alguns exemplares poderem ser classificados no grupo D (CLERMONT *et al.*, 2000; SABATÉ *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009; EUSEBIO *et al.*, 2016). É importante salientar que a seleção de amostras UPEC foi isolada de pacientes que procuraram o HCPA devido à infecção urinária. Desta forma, esta maior frequência do grupo B2 já era esperada.

Além disto, a fronteira entre o comensalismo e a virulência resulta de um complexo equilíbrio entre o status do hospedeiro e a presença ou expressão de fatores de virulência nas bactérias (PICARD *et al.*, 1999). O status do hospedeiro, além da condição sanitária, também se refere a fatores associados. Como exemplo, entre os isolados UPEC, houve uma maior frequência de pacientes do sexo feminino (80,6%). O

fator de risco do hospedeiro, com imunidade baixa, devido à gravidez e diabetes, que propiciam o estabelecimento de cistites, está diretamente associado à ação de bactérias com maior patogenicidade (EUSEBIO *et al.*, 2016). Contudo, os isolados foram classificados no grupo filogenético B2 (53,2%), independentemente do gênero. Isto é, não houve associação significativa ( $p > 0,05$ ) entre o sexo e a classificação dos isolados nos quatro grupos filogenéticos.

Por outro lado, a distribuição dos isolados do patotipo APEC não ocorreu de maneira similar a de outros trabalhos, os quais geralmente apresentam predominância do grupo A (RODRIGUES-SIEK *et al.*, 2005; EWERS *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2009). A distribuição de isolados do patotipo APEC nos grupos filogenéticos caracteriza-se pela variabilidade, sendo geralmente relacionada à origem dos isolados (CLERMONT *et al.*, 2000). Como exemplo Barbieri (2010) determinou os grupos filogenéticos de 41 isolados de *E. coli* de infecções sistêmicas e 144 de celulite, mais de 50% dos isolados pertenciam ao grupo D. Sendo as cepas de colisepticemia na maioria pertencentes ao grupo D e menor proporção aos grupos B2 e A, e os isolados de celulite com 62,1% no grupo D. O grupo B1 teve somente 8,1% de todos os isolados testados.

Em outro trabalho, Campos *et al.* (2008) demonstraram que a análise filogenética de linhagens comensais e causadoras de onfalite pertenceram principalmente ao grupo filogenético A, não patogênico. Isolados causadores de síndrome da cabeça inchada pertenceram, em sua maioria, ao grupo patogênico D. Linhagens causadoras de septicemia pertenceram aos grupos A e D. Estes dados sugerem que linhagens APEC causadoras de septicemia provavelmente têm uma origem ancestral múltipla, ou seja, uma derivada de uma linhagem patogênica e outra de uma linhagem não patogênica que possivelmente evoluiu através da aquisição horizontal de genes de virulência. Isolados causadoras de síndrome da cabeça inchada possivelmente constituem um grupo clonal patogênico. Por outro lado, isolados causadores de onfalite possivelmente constituem um grupo clonal não patogênico, que, possivelmente causam a doença devido a uma infecção oportunista.

Escobar-Páramo *et al.* (2006) citam que características específicas das populações comensais de *E. coli* de humanos e animais podem ser relacionadas ao tipo de ambiente e hospedeiro. Segundo Clermont *et al.* (2011b) os isolados de *E. coli* de humanos e animais possuem um passado genético comum, contudo diferenças são

vistas na distribuição dos fatores de virulência entre cepas humanas (B2) e não humanas (não B2).

Santos *et al.* (2013) apresentaram um estudo que incluiu 74 isolados de bacteremia de *E. coli* de 74 pacientes hospitalizados na cidade de São Paulo, (43 homens e 31 mulheres) com idade média de 43 anos, com a maioria dos pacientes apresentando condições imuno-debilitantes. A classificação filogenética das estirpes de *E. coli* estudadas pertenciam aos filo grupos B2 (35,1%) e D (29,7%); e aos filo grupos B1 (18,9%) e A (16,2%). Foi proposto que o clima, a população, hábitos e uso de antibióticos influenciam os efeitos filogenéticos e a composição de *E. coli* na microbiota intestinal. Isso poderia explicar as diferenças observadas na filogenia das estirpes de *E. coli* envolvidas na secreção extra intestinal, nas infecções em diversas áreas geográficas, uma vez que esses patógenos podem fazer parte da microbiota intestinal (Santos *et al.*, resultados não publicados). Os autores salientam ainda que, este fato, faz com que a literatura seja unânime em considerar as ExPEC como sendo um grupo que ainda está em processo de remodelação genética, e que a esse respeito, recentemente foi reportada a emergência do "grupo clonal A", composto de amostras do filo grupo D, portadoras de diversos fatores de virulência. Simultaneamente, no ano de 2008, foi relatada na Europa e África a emergência de clones oriundos do filo grupo B2, super-virulentos e multirresistentes. Estudo recente, realizado com amostras de ExPEC isoladas de bacteremia, confirmou o predomínio dos grupos B2 e D entre as amostras virulentas. Entretanto, esse mesmo estudo revelou uma frequência elevada de isolados dos grupos A e B1, muito dos quais portavam uma variedade de fatores de virulência (FVs), questionando sua classificação como meros comensais. Assim, levantamos a hipótese de que as amostras dos grupos A e B1 isoladas nessa pesquisa possam ser produto da remodelação genética detectada em outras regiões geográficas.

Esta situação é observada no atual estudo, considerando-se os grupos filogenéticos das amostras e a sua relação com a origem – cama, celulite, lesão respiratória - e a patogenicidade dos isolados.

Na Tabela 3 são apresentadas as frequências absoluta e relativa (%) dos genes de virulência, conforme o patotipo das cepas de *E. coli*.

Tabela 3 – Frequências absoluta e relativa (%) da presença dos genes de virulência conforme o patotipo das cepas de *Escherichia coli*.

(continua)

| Função do gene      | Gene             | APEC – n (%) | UPEC – n (%) |
|---------------------|------------------|--------------|--------------|
| Adesinas            | <i>crl</i>       | 443 (96,3)   | 421 (93,54)  |
|                     | <i>papG</i>      | 54 (11,7)    | 329 (73,23)  |
|                     | <i>fimH</i>      | 427 (92,8)   | 143 (31,85)  |
|                     | <i>mat</i>       | 394 (85,7)   | 400 (88,86)  |
|                     | <i>sfa/focCD</i> | 8 (1,7)      | 91 (20,27)   |
|                     | <i>afa/drab</i>  | 31 (6,7)     | 92 (20,49)   |
|                     | <i>iha</i>       | 44 (9,6)     | 126 (28,06)  |
|                     | <i>hlyA</i>      | 178 (38,7)   | 252 (56,12)  |
|                     | <i>fimC</i>      | 444 (96,5)   | 358 (79,51)  |
|                     | <i>papC</i>      | 123 (26,7)   | 283 (62,81)  |
|                     | <i>tsh</i>       | 199 (43,3)   | 62 (13,81)   |
| <i>felA</i>         | 24 (5,2)         | 94 (20,94)   |              |
| Toxinas             | <i>cnf1/2</i>    | 13 (2,8)     | 265 (59,02)  |
|                     | <i>hlyA</i>      | 27 (5,9)     | 165 (36,75)  |
|                     | <i>sat</i>       | 127 (27,3)   | 255 (56,79)  |
|                     | <i>vat</i>       | 103 (22,4)   | 207 (46,10)  |
|                     | <i>EAST1</i>     | 210 (45,7)   | 73 (16,26)   |
| Aquisição de ferro  | <i>ireA</i>      | 239 (52)     | 70 (15,59)   |
|                     | <i>fyuA</i>      | 120 (34,8)   | 295 (65,48)  |
|                     | <i>sitD.ep</i>   | 309 (67,2)   | 84 (18,71)   |
|                     | <i>iron1</i>     | 322 (70)     | 158 (35,19)  |
|                     | <i>sitD</i>      | 136 (29,6)   | 270 (60,13)  |
|                     | <i>chuA</i>      | 260 (56,5)   | 324 (71,94)  |
|                     | <i>iucD</i>      | 335 (72,8)   | 252 (56,12)  |
|                     | <i>irp2</i>      | 217 (47,2)   | 292 (64,81)  |
| <i>iutA</i>         | 313 (68)         | 422 (93,76)  |              |
| Resistência ao soro | <i>neuC</i>      | 108 (23,5)   | 148 (32,96)  |
|                     | <i>traT</i>      | 411 (89,3)   | 277 (61,47)  |
|                     | <i>kpsMTII</i>   | 298 (64,8)   | 378 (83,96)  |
|                     | <i>ompA</i>      | 440 (95,7)   | 407 (90,42)  |
|                     | <i>cvi/cva</i>   | 241 (52,4)   | 229 (51,0)   |
|                     | <i>iss</i>       | 336 (73)     | 183 (40,76)  |
|                     | <i>cvaC</i>      | 233 (50,7)   | 130 (28,95)  |

(conclusão)

| Função do gene | Gene        | APEC – n (%) | UPEC – n (%) |
|----------------|-------------|--------------|--------------|
| Invasinas      | <i>ibeA</i> | 127 (27,6)   | 72 (16,04)   |
|                | <i>gimB</i> | 72 (15,7)    | 66 (14,70)   |
|                | <i>tia</i>  | 112 (24,3)   | 222 (49,44)  |
| PAI            | <i>malX</i> | 96 (20,9)    | 298 (66,15)  |
| Protease       | <i>pic</i>  | 81 (17,6)    | 120 (26,73)  |

Rodrigues-Siek *et al.* (2005) entre isolados APEC e UPEC encontraram 98% de frequência para os genes *feoB* e *fimH*, localizados no plasmídeo *pTJ100*, mais comumente encontrado entre cepas de origem aviária. A maioria dos genes localizados nos cromossomos estava amplamente distribuída entre os isolados, independentemente do hospedeiro e do patotipo, com exceção dos genes *iha*, *afa/draB*, *sfa/oc* e *hlyA*. Os genes associados aos plasmídeos ColV (*tsh*, *iss*) foram mais frequentes em APEC, indicando que estes isolados poderiam ser uma fonte de genes localizados em ColV para outras estirpes de ExPEC.

Inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos para avaliar as possíveis semelhanças entre os patotipos APEC e UPEC, com o objetivo de avaliar a possibilidade de uma zoonose. Embora estudos anteriores tenham comparado os genes de virulência entre UPEC e APEC, não existem estudos comparando a expressão dos genes de virulência específicos entre estes patotipos em um mesmo modelo de desafio *in vivo* (ZHAO *et al.*, 2009). Uma vez que as estirpes *E. coli* de humanos e aves enfrentam desafios semelhantes ao estabelecer infecção em locais extra intestinais eles podem compartilhar genes de virulência e capacidade de causar doença (JOHNSON *et al.*, 2005; MOULIN SCHOULER *et al.*, 2007). Uma vez que ambos patotipos utilizam semelhantes fatores de virulência, como adesinas, sistemas de aquisição de ferro, toxinas, protectinas e invasinas, é necessário determinar se cepas APEC são responsáveis pelas UTIs ou se atuam somente como uma espécie de reservatório para os genes de virulência RODRIGUES-SIEK *et al.*, 2005. Outros autores já demonstraram o compartilhamento de genes entre cepas APEC e UPEC. Em estudo realizado por ZHAO *et al.*, 2009, a cepa U17, de origem humana, e a cepa E058, de origem aviária, compartilharam 20 dos 37 genes de virulência pesquisados. Por outro lado, a cepa EHEC 933, também de origem humana, compartilhou apenas seis destes genes com a cepa U17. Com base nestes resultados, os autores afirmam que UPEC U17 é mais

semelhante à cepa APEC E058 do que a EHEC 933. Alguns fatores de virulência podem estar ausentes em cepas APEC sem que essas deixem de ser patogênicas. Com exceção da fímbria F1 outros genes de virulência estão ausentes nas cepas não-patogênicas. Fatores de virulência diferentes desempenham a mesma função atuando no mesmo sítio do hospedeiro e por isso cepas geneticamente diferentes podem produzir a mesma infecção (BARBIERI, 2010). Na Tabela 4 estão descritas as frequências dos genes de virulência pesquisados para cada grupo filogenético das cepas APEC e UPEC.

Tabela 4 – Frequência relativa (%) dos 38 genes de virulência pesquisados para cada grupo filogenético (A, B1, B2 e D) entre as cepas APEC e UPEC.

(continua)

| Gene             | APEC  |      |       |      | UPEC |      |      |      |
|------------------|-------|------|-------|------|------|------|------|------|
|                  | A     | B1   | B2    | D    | A    | B1   | B2   | D    |
| <i>crl</i>       | 103,3 | 96,4 | 94,8  | 93,0 | 95,6 | 96,3 | 90,9 | 96,5 |
| <i>papG</i>      | 8,9   | 7,2  | 16,4  | 13,3 | 69,1 | 70,4 | 68,5 | 86,0 |
| <i>fimH</i>      | 93,3  | 86,5 | 94,8  | 95,8 | 25,0 | 14,8 | 41,1 | 20,2 |
| <i>mat</i>       | 90,0  | 84,7 | 83,6  | 85,3 | 82,4 | 92,6 | 88,4 | 92,1 |
| <i>sfa/focCD</i> | 0,0   | 0,9  | 4,3   | 1,4  | 2,9  | 3,7  | 31,5 | 10,5 |
| <i>afa/drab</i>  | 10,0  | 7,2  | 5,2   | 5,6  | 23,5 | 25,9 | 20,7 | 16,7 |
| <i>iha</i>       | 11,1  | 4,5  | 9,5   | 12,6 | 11,8 | 18,5 | 31,5 | 32,5 |
| <i>hrlA</i>      | 30,0  | 30,6 | 49,1  | 42,0 | 52,9 | 37,0 | 64,3 | 44,7 |
| <i>fimC</i>      | 97,8  | 93,7 | 98,3  | 96,5 | 88,2 | 85,2 | 78,0 | 75,4 |
| <i>papC</i>      | 27,8  | 23,4 | 25,0  | 30,1 | 50,0 | 37,0 | 67,2 | 66,7 |
| <i>tsh</i>       | 35,6  | 22,5 | 58,6  | 51,7 | 11,8 | 3,7  | 18,3 | 7,9  |
| <i>felA</i>      | 0,0   | 7,2  | 5,2   | 7,0  | 19,1 | 22,2 | 22,4 | 18,4 |
| <i>cnf1/2</i>    | 1,1   | 0,9  | 6,9   | 2,1  | 35,3 | 33,3 | 69,7 | 56,1 |
| <i>hlyA</i>      | 10,0  | 3,6  | 3,4   | 7,0  | 25,0 | 7,4  | 53,1 | 15,8 |
| <i>sat</i>       | 35,6  | 43,2 | 13,8  | 21,7 | 67,6 | 63,0 | 52,3 | 57,9 |
| <i>vat</i>       | 13,3  | 6,3  | 34,5  | 30,8 | 36,8 | 25,9 | 59,3 | 28,1 |
| <i>EAST1</i>     | 48,9  | 43,2 | 42,2  | 48,3 | 30,9 | 7,4  | 15,4 | 11,4 |
| <i>ireA</i>      | 38,9  | 26,1 | 58,6  | 74,8 | 5,9  | 11,1 | 19,9 | 13,2 |
| <i>fyuA</i>      | 24,4  | 10,8 | 58,6  | 40,6 | 42,6 | 29,6 | 79,3 | 57,9 |
| <i>sitD.ep</i>   | 64,4  | 55,9 | 73,3  | 72,7 | 32,4 | 25,9 | 13,3 | 20,2 |
| <i>iroNI</i>     | 64,4  | 64,9 | 77,6  | 71,3 | 29,4 | 29,6 | 44,8 | 19,3 |
| <i>sitD</i>      | 30,0  | 29,7 | 42,2  | 18,9 | 39,7 | 40,7 | 74,3 | 46,5 |
| <i>chuA</i>      | 1,1   | 0,0  | 101,7 | 98,6 | 25,0 | 29,6 | 83,4 | 85,1 |
| <i>iucD</i>      | 61,1  | 54,1 | 83,6  | 86,0 | 50,0 | 25,9 | 56,0 | 66,7 |
| <i>irp2</i>      | 28,9  | 21,6 | 69,0  | 60,8 | 54,4 | 37,0 | 72,2 | 61,4 |
| <i>iutA</i>      | 55,6  | 50,5 | 76,7  | 82,5 | 89,7 | 85,2 | 94,2 | 96,5 |
| <i>neuC</i>      | 33,3  | 11,7 | 38,8  | 14,0 | 44,1 | 44,4 | 29,0 | 31,6 |

(conclusão)

| Gene           | APEC  |      |      |      | UPEC |      |      |      |
|----------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
|                | A     | B1   | B2   | D    | A    | B1   | B2   | D    |
| <i>traT</i>    | 88,9  | 82,9 | 93,1 | 91,6 | 63,2 | 74,1 | 58,9 | 62,3 |
| <i>kpsMTII</i> | 58,9  | 58,6 | 75,9 | 64,3 | 63,2 | 77,8 | 88,0 | 88,6 |
| <i>ompA</i>    | 101,1 | 92,8 | 95,7 | 94,4 | 95,6 | 92,6 | 87,6 | 92,1 |
| <i>cvi/cva</i> | 48,9  | 55,0 | 61,2 | 45,5 | 54,4 | 37,0 | 50,6 | 52,6 |
| <i>iss</i>     | 64,4  | 71,2 | 79,3 | 74,8 | 42,6 | 44,4 | 42,3 | 35,1 |
| <i>cvaC</i>    | 46,7  | 36,9 | 74,1 | 44,8 | 22,1 | 14,8 | 33,2 | 27,2 |
| <i>ibeA</i>    | 18,9  | 19,8 | 46,6 | 23,8 | 2,9  | 7,4  | 22,4 | 12,3 |
| <i>gimB</i>    | 14,4  | 14,4 | 24,1 | 10,5 | 16,2 | 7,4  | 15,8 | 13,2 |
| <i>tia</i>     | 32,2  | 14,4 | 25,9 | 25,9 | 50,0 | 48,1 | 53,9 | 39,5 |
| <i>malX</i>    | 23,3  | 16,2 | 34,5 | 11,9 | 42,6 | 55,6 | 81,7 | 49,1 |
| <i>pic</i>     | 7,8   | 6,3  | 18,1 | 32,2 | 14,7 | 22,2 | 29,5 | 28,9 |

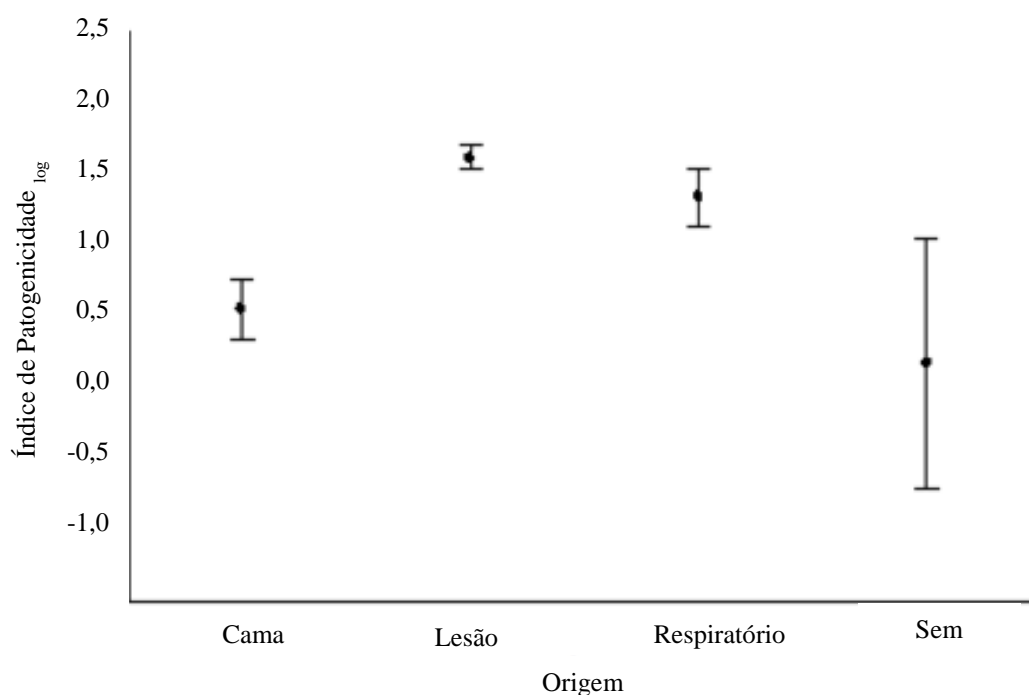
Em relação à associação estatística entre a presença de determinado gene de virulência e os grupos filogenéticos no patotipo APEC, dez genes (*cnf1/2*, *hlyA*, *EAST1*, *tia*, *sfa/focCD*, *afa/drab*, *ihA*, *felA*, *papG*, *traT*) não apresentam associação com nenhum dos grupos, e cinco deles (*crl*, *mat*, *ompA*, *fimC* e *fimH*) apresentaram uma frequência superior a 80% em todos os grupos. Os genes *ireA*, *sitD ep*, *iroN1*, *chuA*, *iuCD*, *iutA* e *iss* apresentaram associação com o grupo filogenético D, sendo *ireA* exclusivamente com este grupo. Os genes *sitD ep*, *iroN1*, *chuA*, *iuCD*, *iutA*, *kpsMT II*, *iss* e *cvaC* demonstraram associação com o grupo B2, sendo *kpsMT II* e *cvaC* exclusivamente com este grupo. Apenas os genes *iss* e *sat* apresentaram associação com o grupo B1, sendo *sat* exclusivamente com este grupo. Para todos estes genes, com exceção de *sat*, a frequência foi igual ou superior a 75% dentro dos respectivos grupos filogenéticos.

Em relação à associação estatística entre a presença de determinado gene de virulência e os grupos filogenéticos no patotipo UPEC, 15 genes (*crl*, *sat*, *mat*, *afa/drab*, *neuC*, *fimC*, *piC*, *ompA*, *gimB*, *traT*, *cvi/cva*, *iss*, *felA*, *iutA*, *cvaC*) não apresentam associação com nenhum dos grupos, e quatro deles (*ireA*, *sfa/focCD*, *ibeA*, *tsh*) apresentaram frequência superior a 70% em todos os grupos. Os genes *fyuA*, *iroN1* e *chuA*, *ihA*, *papG*, *fimH*, *cnf 1/2* e *hlyA* estão associados com o grupo A, sendo *iroN1* associado exclusivamente com este grupo. Os genes *fyuA*, *chuA*, *iucD*, *irp2*, *cnf 1/2*, *hlyA*, *vat*, *EAST1*, *adesina ihA*, *papG*, *papC* e *fimH* estão relacionados com o grupo B1, sendo os genes *iucD*, *papC* e *irp2* associados exclusivamente com este grupo. *sitD ep* e *EAST1* estão associados com o grupo B2, e *hlyA*, *sitD ep*, *vaT*, *EAST1* e *fimH* com o grupo A.



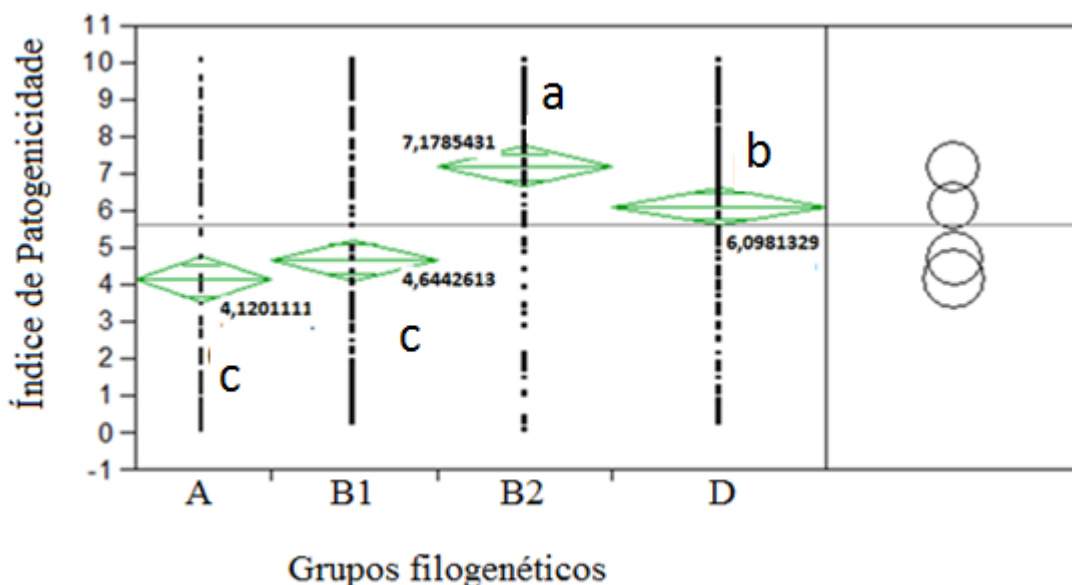
No Gráfico 1 estão descritas as associações entre os índices de patogenicidade e a origem de isolamento das cepas de *E. coli* APEC. Observou-se diferença significativa entre os índices de patogenicidade conforme a fonte de isolamento. As cepas isoladas de cama apresentaram índices de patogenicidade significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que aquelas isoladas de lesão de celulite e do trato respiratório. Por outro lado, as cepas isoladas de lesões apresentaram índices de patogenicidade significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que aquelas sem origem definida.

Gráfico 1 – Associação do índice de patogenicidade (IP) com a origem dos isolamento das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.



No Gráfico 2 estão demonstradas a associação estatística dos grupos filogenéticos com a média dos índices de patogenicidade (IP) dos 460 isolados de *E. coli* APEC que foram classificadas nos quatro grupos.

Gráfico 2 – Associação dos quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) observados com a média dos índices de patogenicidade (IP) para os 460 isolados de *Escherichia coli* APEC.



Os resultados demonstram uma associação direta entre os índices de patogenicidade obtidos *in vivo* e os grupos filogenéticos, conforme a literatura (CLERMONT *et al.*, 2000). Os isolados do grupo B2 apresentaram um índice de patogenicidade médio de 7,17, seguido pelo grupo D com média de 6,09 e dos isolados dos grupos A e B1, considerados comensais, com médias de 4,1 e 4,6, respectivamente. A média do índice de patogenicidade dos isolados do grupo B2 foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em relação à média do grupo D. Além disto, os índices de patogenicidade destes dois grupos foram significativamente superiores aos índices das amostras dos grupos A e B1. Os resultados demonstram que a classificação de *E. coli* em grupos filogenéticos descrito por Clermont *et al.* (2000) a partir de um protocolo de m-PCR permite inferir a patogenicidade da bactéria, dividindo-a em três grupos de patogenicidade: alta (B2), intermediária (D) e baixa (A e B1). Esta ferramenta torna-se uma alternativa para a monitorização rotineira de granjas avícolas e o traçado das flutuações na patogenicidade. Feito isso, teremos pontos de referência para relacionar com fenômenos ou procedimentos ocorridos no período estudado. O uso de uma vacina com alguns genes silenciados, muitos em seu estado natural, por manipulação genética pode indiretamente oferecer um arsenal de fatores de virulência que jogados no ambiente pode criar condições para que por rearranjos genéticos haja o surgimento de bactérias virulentas.

A pesquisa de 38 genes de virulência de *E. coli* no CDPA tem sido utilizada como variável para a predição da patogenicidade desta bactéria através do emprego de redes neurais artificiais (TEJKOWSKI, 2008). Contudo, esta etapa fundamental, que consiste na elaboração de reações de multiplex-PCR, é bastante laboriosa, pois envolve a realização de seis diferentes protocolos e a interpretação minuciosa dos resultados a partir da visualização de diversas bandas de DNA no gel de agarose. Além do longo período necessário para obtenção dos resultados, há o custo para aquisição dos reagentes necessários. Por outro lado, a classificação de *E. coli* em grupos filogenéticos através do protocolo selecionado no atual estudo envolve uma única reação. Como a distribuição das cepas APEC nos grupos filogenéticos apresentou associação significativa com a patogenicidade, o multiplex-PCR torna-se uma importante ferramenta disponível para o *screening* da patogenicidade das amostras isoladas na cadeia avícola.

## 6 CONCLUSÕES

1. O protocolo de multiplex-PCR adaptado foi capaz de diferenciar 100% dos isolados de *E. coli* APEC e UPEC nos quatro grupos filogenéticos propostos.
2. A maioria dos isolados de *E. coli* do patotipo APEC foi classificada nos grupos filogenéticos D (31,1%) e B2 (25,2%), ratificando o modelo de classificação de patogenicidade *in vivo* das cepas APEC elaborado pelo CDPA em trabalhos anteriores, já que houve associação significativa com os grupos filogenéticos, sendo que os grupos B2 e D apresentaram índices de patogenicidade superiores aos observados pelos isolados considerados comensais dos grupos A e B1.
3. No patotipo UPEC, o grupo B2 foi majoritário (53,6%). Esta distribuição mantém associação com a origem e a patogenicidade das cepas.
4. Observou-se associação entre determinados genes e os grupos filogenéticos, tanto para cepas APEC quanto UPEC.
5. O multiplex-PCR torna-se uma importante ferramenta disponível no laboratório para o acompanhamento da flutuação da patogenicidade das amostras de *E. coli* APEC.

## REFERÊNCIAS

- ALM, E.W., WALK, S.T., GORDON, D.M. The niche of *Escherichia coli*. In Population Genetics of Bacteria. **Washington, DC, USA: ASM Press**, pp. 107–123. . (2011).
- ALMEIDA A.M.S. **Características Biológicas e Antigênicas de *Escherichia coli* com Ênfase aos Genes de Virulência**. Dissertação de Mestrado, Seminário apresentado junto à Disciplina de Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás 2013.
- ANANIAS M.; YANO T. Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. **Braz J Med Biol Res.** Oct; 41(10):877-83, 2008.
- BARBIERI N.L. **Resistência a antibióticos, prevalência dos fatores associados a virulência tipagem filogenética e perfil filogenético de isolados de *Escherichia coli* patogênica aviária**. 2010. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- BARNES, H. J.; NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J. P. Colibacillosis. In. Calnek, B. D. (Ed.) **Diseases of poultry**. 12th ed. Ames: University Press, p. 691-738, 2008.
- BARNES H.J, VAILLANCOURT J.P. & GROSS W.B. 2003. Newcastle disease, p.631-656. In: Ibid. (Ed.), **Diseases of Poultry**. 11th ed. Iowa State University Press, Ames.
- BARNES, H.J.; GROSS, W.G. Colibacillosis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; REID, W. M.; YODER, Jr, H.W. Diseases of poultry. 10th ed. Iowa Sate University Press, Ames, Iowa, p.138-44, 1997.
- BERGTHORSSON U.; OCHMAN H. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*, **Molecular Biology and Evolution**, Volume 15, Issue 1 Pp. 6-16, 1998.
- BIEN J., SOKOLOVA O., BOZKO P., Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. **Hindawi Publishing Corporation International Journal of Nephrology**, Volume 2012, Article ID 681473, 15 pages Review Article Received 1 August 2011; Revised 2 November 2011; Accepted 1 December 2011.
- CAMPOS T.A., LAGO J.C.; NAKAZATO G.; STEHLING E.G. BROCCHI M.; CASTRO A.F.P.; SILVEIRA W.D., Occurrence of virulence-related sequences and phylogenetic analysis of commensal and pathogenic avian *Escherichia coli* strains (APEC). **Pesq. Vet. Bras.**, 28 (10): 533-540, Depto Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), 2008.

COLLINGWOOD C.; KEMMETT K.; WILLIAMS N.; WIGLEY P., Is the concept of avian pathogenic *Escherichia coli* as a single pathotype fundamentally flawed? **Frontiers in Veterinary Science | Veterinary Infectious Diseases**, Published: 14 October 2014.

DE CARLI S.; IKUTA N.; LEHMANN F.K.M.; SILVEIRA V.P.; PREDEBON G.M.; FONSECA A.S.K.; LUNGE V.R., Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil., **Poultry Science Association Inc.** Received March 21, 2015. Accepted July 17, 2015.

CUNHA. M.P. V; MENAO. M.C.; FERREIRA. A.J.P.; KNOBL. T.; A similaridade genética de *Escherichia coli* patogênica para as aves (APEC) com estirpes humana e a resistência antimicrobiana justifica a preocupação sanitária em relação aos produtos de origem aviária? **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP Continuous Education Journal in Veterinary Medicine and Zootechny of CRMV-SP. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 11, n. 2 (2013), p. 24 – 33, 2013.**

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

CLERMONT, O., OLIER, M., HOEDE, C., DIANCOURT, L., BRISSE, S., KEROUDEAN, M., et al. (2011a) Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infect Genet Evol** 11: 654–662.

CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E.; Characterization of an anonymous molecular marker strongly linked to *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis. **J Clin Microbiol** 42: 1770–1772, 2004.

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

CROXEN M.A.; FINLAY B.B. Mecanismos moleculares de *Escherichia coli* patogenicidade Nature Reviews, **Microbiology** 8, 26-38, 2010.

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

DOBRINDT U.; GEDDAM M.; KRUMBHOLZ G.; HACKER J. Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. **Med Microbiol Immunol** 199:145–154, 2010.

DOBRINDT U., HOCHHUT, B., HACKER J., Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. **Nat. Rev. Microbiol.** 2, 414–424. doi: 10.1038/nrmicro884 2004.

DOBRINDT U., BLUM-OEHLER G. ; NAGY G.; SCHNEIDER G.; JOHANN A., GOTTSCHALK G, HACKER J. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. **Infect Immun.** Nov;70(11):6365-72, 2002.

DOBRINDT U., HACKER J. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. **Current Opinion in Microbiology.** Volume 4 Issue 5, pages 550-557, 2001.

ESCOBAR-PÁRAMO P.; LE MENACH A.; LE GALL T.; AMORIM C.; GOURIOU S.; PICARD B.; *et al.* Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. **Environ. Microbiol.** ;8:1975–1984, 2006.

EUSÉBIO A., ARAUJO C., ANDRADE M., DUARTE A. *Escherichia coli* nas infecções urinárias da comunidade: comensal ou patogénica? Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal iMed.UL, **Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences**, Lisboa, Portugal fevereiro de 2016.

EWERS, C. *et al.* Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 297, n. 3, p. 163-176, 2007.

FERREIRA, A.J.P.; KNÖBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI JUNIOR A.; SILVA, E.N.; Di FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (Ed.). **Doença das aves**. 2th ed. Campinas: FACTA, cap.4.2, p.457-471, 2009.

FERREIRA, A. J. P.; KNOBL, T. Colibacilose. IN: JUNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L. ZUANAZE, M. A. Doença das aves. 2 ed. Campinas: Fundação APINCO. p.457-471, 2009.

FERREIRA, A.J.P.; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI JUNIOR, A. & MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, p.197-207, 2000.

FOXMAN B.; GILLESPIE B.; KOOPMAN J.; ZHANG L.; PALIN K.; TALLMAN P.; MARSH J. V.; SPEAR S.; SOBEL J. D.; JOAN MARTY M.; MARRS C. F., RISK Factors for Second Urinary Tract Infection among College Women, **American Journal of Epidemiology Copyright** 2000.

GORDON M.D.; CLERMONT O.; TOLLEY H.; DENAMUR E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the pcr method, **enviromental microbiology**, 10 (10), 2484-2496, 2008.

GORDON D.M.; COWLING A., The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects, **Microbiology**, 149, 3575–3586, 2003.

GROZDANOV L.; RAASCH C.; SCHULZE J; SONNENBORN U; GOTTSCHALK,G; HACKER J; DOBRINDT U. Analysis of the Genome Structure

- of the Nonpathogenic Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917. **J Bacteriol.** Aug; 186(16): 5432–5441,2004.
- HACKER J.; KAPER J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol.* 54:641-79. 2000.
- HENTSCHEL U.; HACKER J. Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. **Microbes and Infection**, 3, 2001, 545–548 2001.
- JOHNSON T.J.; LOGUE C.M.; WANNEMUEHLER Y.; KARIYAWASAM S.; DOETKOTT C.; DEBROY C.; WHITE D.G.; NOLAN L.K., Examination of the Source and Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Contaminating Retail Poultry Meat, **Foodborne Pathogens and Diseases**, Volume 6, Number 6, 2009 <sup>a</sup> Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089.
- JOHNSON, T. J. *et al.* Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. **Journal of clinical microbiology**, p. 3987–3996, dec. 2008.
- JOHNSON, J.R.; RUSSO T.A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 295, n. 6-7, p. 383-404, Oct. 2005.
- JOHNSON, J. R.; DELAVERI, P.; KUSKOWSKI, M.; STELL, A. L. (2001). Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. **J Infect Dis** 183, 78–88, 2001.
- JOHNSON, J.R.; STELL, A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261–272, 2000.
- KAPER J.B.; NATARO J.P., MOBLEY H.L.; KAUFFMANN, F. Pathogenic *Escherichia coli*, **Nat Rev Microbiol.**, Feb; 2(2):123-40, 2004.
- LEE, M.D.; NOLAN, L.K. DUFOUR-ZAVALA, L., Colibacillosis In: **A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens**. 5. ed. Georgia: American Association of Avian Pathologists, 2008. p. 10-11.
- MANGES A. R., JOHNSON J. R., FOXMAN B., O'BRYAN T. T., FULLERTON K. E., RILEY L.W., Widespread Distribution of Urinary Tract Infections Caused by a Multidrug-resistant *Escherichia coli* Clonal Group. **The New England Journal of Medicine**, volume 345 october 4, 2001 number 14.
- MOBLEY H.L.T.; ALTERI C.J., Development of a Vaccine against *Escherichia coli* Urinary Tract Infections, **Department of Microbiology and Immunology**, Academic Editor: Catharina Svanborg, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Received: 11 September 2015; Accepted: 29 December 2015; Published: 31 December 2015.



MORENO E.; PRATS G.; PLANELLS I.; PLANES A.; PÉREZ T.; ANDREU A. Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. Vol. 24. Núm. 08. Octubre 2006.

MOULIN-SCHOULEUR M.; RÉPÉRANT M.; LAURENT S.; BRÉE A.; MIGNON-GRASTEAU S.; GERMON P.; RASSCHAERT D.; SCHOULER C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. **J Clin Microbiol.**, Oct; 45(10):3366-76. Epub 2007 Jul 25, 2007.

MOULIN-SCHOULEUR M.; SCHOULER C.; TAILLIEZ P.; KAO M.R.; BREE A.; GERMON P.; OSWALD E.; MAINIL J.; BLANCO M.; BLANCO J., Common Virulence Factors and Genetic Relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* Isolates of Human and Avian Origin, **journal of clinical microbiology**, Oct., p. 3484–3492 Vol. 44, No. 10, 2006.

NAKAZATO G.; CAMPOS T.A.; STEHLING G.; BROCCHI M.; SILVEIRA W.D. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Review, **Pesq. Vet. Bras.** 29(7):479-486, julho 2009.

OELSCHLAEGER, T. A., DOBRINDT U.; HACKER J. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. **Int J Antimicrob Agents** 19, 517–521, 2002.

OLIVEIRA, S.J. Guia Bacteriológico Prático - Microbiologia Veterinária. 3. ed. Canoas: ULBRA, 2012. 260 p.

GARCIA J., PICARD B., SEVALI - GOURIOU S., DURIEZ, P., BRAHIMI N., BINGEN, E., et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extra-intestinal infection. **Infect Immun** 67: 546–553, 1999.

RODRIGUES -SIEK K. E., GIDDINGS C. W., DOETKOTT, C.; JOHNSON T. J.; NOLAN L. K. Characterizing the APEC pathotype. **Vet Res** 36, 241–256, 2005.

ROCHA S.L.S. Detecção de fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de granjas avícolas de RS através do multiplex-PCR. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extra-intestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754. May 2000.

SABATÉ M.; MORENO E.; PÉREZ T.; ANDREU A.; PRATS G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates, **Clinical Microbiology and Infection**, Volume 12, Issue 9, pages 880–886, September 2006.

SANTOS A.C.M. ; . ZIDKO A.C.M ; PIGNATARI A.C. ; Silva R.M. Assessing the diversity of the virulence potential of *Escherichia coli* isolated from bacteremia in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 46: 968-973,2013.

SANTOS A.C.M.; ZIDKO A.C.M.; PIGNATARI A.C.C.; GALES A.C.; SILVA R.M. a virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (expec) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro, **o mundo da saúde**, são paulo: 2009;33(4):392-400,artigo.

SORSA, L. J.; DUFKE S.; HEESEMANN J.; SCHUBEORT, S. Characterization of an iroBCDEN gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. **Infect Immun** 71, 3285–3293, 2003.

SOUZA G. F.; ROCHA S. L. S.; FURIAN T. Q.; BORGES K. A.; SALLE F.O.; MORAES L. B.; MORAES H. L. S.; SALLE C. T. P. Classification of avian pathogenic *Escherichia coli* by a novel pathogenicity index based on an animal model. **Acta sci. vet**; 44: 01-06, 2016.

SOUZA, G. F.; **Estabelecimento de uma nova metodologia para cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* provenientes da produção de frangos de corte**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SUN H.; LIU P.; NOLAN L.K.; LAMONT S., Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) infection alters bone marrow transcriptome in chickens, **BMC Genomics**,2015.

SCHOULER C.; SCHAEFFER B.; BRÉE A.; MORA A.; DAHBI G.; BIET F.; OSWALD E.; MAINIL J.; BLANCO J.; MOULIN-SHOULER M., Diagnostic Strategy for Identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* Based on Four Patterns of Virulence Genes, **Journal of Clinical Microbiology** p. 1673–1678 Received 10 July 2011 Returned for modification 27 August 2011, Accepted 21 February 2012 Published ahead of print 29 February 2012.

TIBA M.; YANO R.; LEITE T. D. S., Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis, **Rev. Inst. Med. trop.** S. Paulo 50(5):255-260, September-October, 2008.

VIEIRA T.;B.,**Caracterização de *Escherichia coli* Isolados de Miúdos e Carcaça com Celulite por RAPD e Detecção dos Genes *iss* e *felA* por PCR**, Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor – Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, 2010.

TEJKOWSKI T.M.,**Perfil da patogenicidade de *Escherichia coli* patogênica para as aves (APEC) através da utilização de Redes Neurais Artificiais (RNAs)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

- TENAILLON O.; SKURNIK D., PICARD B., DENAMUR E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol.** Mar; 8(3):207-17, 2010.
- TOUCHON M., HOEDE C., TENAILLON O., BARBE V., BAERIWYL S., BIDET P., et al. Organised genome dynamics in *Escherichia coli* results in highly diverse adaptive paths. **PLoS Genet** 5:, 2009.
- TOUZAIN F.; DENAMUR E; MÉDIGUE C.; BARBE V.; EL KAROUI M.; PETIT M.A. Small variable segments constitute a major type of diversity of bacterial genomes at the species level, **Genome Biology**, 2010.
- TRABULSI, R.L.; ALTETHUM, F.. **Microbiologia** 4ª edição revisada e atualizada. São Paulo Atheneu; 2005.
- VIEIRA M.A.M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, São Paulo: 33(4):406-414. artigo de revisão, 2009.
- WALK S. T.; ALM E. W.; GORDON D. M.; RAM J. L.; TORANZOS G. A. *et al.* Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. **Appl. Environ. Microbiol.** 75: 6534–654, 2009.
- WALK T.S.; ALM E.W.; CALHOUN L.M.; MLADONICKY J.M.; WHITTAM T. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches, **Environmental Microbiology**, Volume 9, Issue 9, pages 2274–2288, September 2007.
- WILES T.J., KULESUS R. R., MULVEY M.A., Origins and Virulence Mechanisms of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Division of Cell Biology and Immunology, Pathology Department, University of Utah**, Author manuscript; available in PMC 2009 August 1. Published in final edited form as: *Exp Mol Pathol.* 2008 .
- ZHAO, L. GAO, S.; HUAN, H.X.; XU, X.J.; ZHU, X.P.; YANG, W; GAO, Q.Q.; LIU, X.F. Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. **Microbiology**, v. 155, p. 1634–1644, 2009.

APÊNDICE A – Origem, índice de patogenicidade e grupo filogenético das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

(continua)

| Número | Identificação da cepa | Origem de isolamento | Índice de Patogenicidade | Grupo Filogenético |
|--------|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
| 1      | 1                     | celulite             | 5,89                     | D                  |
| 2      | 3                     | cama aviária         | 1,50                     | A                  |
| 3      | 4                     | cama aviária         | 1,63                     | B2                 |
| 4      | 5                     | cama aviária         | 0,80                     | B1                 |
| 5      | 6                     | celulite             | 9,83                     | B1                 |
| 6      | 7                     | celulite             | 10,00                    | D                  |
| 7      | 8                     | celulite             | 8,04                     | D                  |
| 8      | 9                     | celulite             | 9,66                     | B2                 |
| 9      | 10                    | cama aviária         | 0,20                     | A                  |
| 10     | 11                    | celulite             | 2,80                     | B2                 |
| 11     | 14                    | celulite             | 1,94                     | A                  |
| 12     | 15                    | celulite             | 4,61                     | D                  |
| 13     | 16                    | celulite             | 10,00                    | D                  |
| 14     | 17                    | celulite             | 10,00                    | D                  |
| 15     | 18                    | celulite             | 9,53                     | B1                 |
| 16     | 19                    | cama aviária         | 1,81                     | A                  |
| 17     | 22                    | celulite             | 7,03                     | B1                 |
| 18     | 23                    | celulite             | 10,00                    | B1                 |
| 19     | 26                    | cama aviária         | 7,73                     | D                  |
| 20     | 27                    | celulite             | 4,36                     | B2                 |
| 21     | 31                    | cama aviária         | 3,81                     | A                  |
| 22     | 32                    | celulite             | 8,61                     | D                  |
| 23     | 33                    | celulite             | 9,14                     | D                  |
| 24     | 34                    | celulite             | 3,37                     | B1                 |
| 25     | 35                    | celulite             | 3,21                     | D                  |
| 26     | 36                    | cama aviária         | 0,60                     | B1                 |
| 27     | 37                    | celulite             | 6,84                     | D                  |
| 28     | 38                    | celulite             | 6,10                     | D                  |
| 29     | 39                    | celulite             | 5,76                     | D                  |
| 30     | 40                    | celulite             | 6,06                     | D                  |
| 31     | 42                    | celulite             | 8,31                     | D                  |
| 32     | 43                    | celulite             | 9,24                     | D                  |
| 33     | 44                    | celulite             | 6,53                     | A                  |
| 34     | 45                    | celulite             | 6,50                     | D                  |
| 35     | 46                    | cama aviária         | 5,17                     | D                  |
| 36     | 48                    | celulite             | 1,51                     | A                  |

APÊNDICE A – Origem, índice de patogenicidade e grupo filogenético das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

(continuação)

| Número | Identificação da cepa | Origem de isolamento | Índice de Patogenicidade | Grupo Filogenético |
|--------|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
| 37     | 49                    | celulite             | 2,76                     | B1                 |
| 38     | 51                    | celulite             | 9,16                     | D                  |
| 39     | 52                    | celulite             | 5,76                     | A                  |
| 40     | 54                    | celulite             | 3,94                     | B1                 |
| 41     | 56                    | celulite             | 9,63                     | D                  |
| 42     | 57                    | celulite             | 2,78                     | B2                 |
| 43     | 61                    | celulite             | 9,00                     | B1                 |
| 44     | 67                    | celulite             | 10,00                    | A                  |
| 45     | 68                    | celulite             | 4,89                     | B1                 |
| 46     | 69                    | celulite             | 6,07                     | A                  |
| 47     | 70                    | celulite             | 7,74                     | A                  |
| 48     | 71                    | cama aviária         | 2,69                     | B1                 |
| 49     | 72                    | cama aviária         | 0,30                     | A                  |
| 50     | 73                    | celulite             | 10,00                    | B2                 |
| 51     | 74                    | celulite             | 10,00                    | B2                 |
| 52     | 75                    | celulite             | 10,00                    | B2                 |
| 53     | 76                    | celulite             | 10,00                    | D                  |
| 54     | 77                    | cama aviária         | 2,49                     | D                  |
| 55     | 79                    | cama aviária         | 1,91                     | A                  |
| 56     | 80                    | celulite             | 7,83                     | A                  |
| 57     | 81                    | celulite             | 7,79                     | D                  |
| 58     | 82                    | celulite             | 2,39                     | B1                 |
| 59     | 83                    | celulite             | 7,10                     | D                  |
| 60     | 84                    | cama aviária         | 1,77                     | B1                 |
| 61     | 85                    | cama aviária         | 1,10                     | B1                 |
| 62     | 86                    | celulite             | 9,73                     | D                  |
| 63     | 87                    | celulite             | 1,34                     | B1                 |
| 64     | 88                    | celulite             | 4,60                     | D                  |
| 65     | 90                    | cama aviária         | 3,59                     | B1                 |
| 66     | 91                    | celulite             | 3,50                     | B1                 |
| 67     | 93                    | celulite             | 3,43                     | A                  |
| 68     | 94                    | cama aviária         | 4,24                     | B1                 |
| 69     | 95                    | cama aviária         | 2,67                     | B1                 |
| 70     | 96                    | celulite             | 2,70                     | B1                 |
| 71     | 97                    | celulite             | 3,10                     | B1                 |
| 72     | 99                    | cama aviária         | 1,63                     | B1                 |

APÊNDICE A – Origem, índice de patogenicidade e grupo filogenético das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

(continuação)

| Número | Identificação da cepa | Origem de isolamento | Índice de Patogenicidade | Grupo Filogenético |
|--------|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
| 73     | 101                   | cama aviária         | 4,26                     | B1                 |
| 74     | 102                   | celulite             | 2,13                     | A                  |
| 75     | 103                   | celulite             | 4,66                     | B1                 |
| 76     | 104                   | celulite             | 2,09                     | B1                 |
| 77     | 105                   | cama aviária         | 2,16                     | B1                 |
| 78     | 106                   | cama aviária         | 0,60                     | A                  |
| 79     | 107                   | celulite             | 6,14                     | D                  |
| 80     | 108                   | celulite             | 10,00                    | D                  |
| 81     | 110                   | celulite             | 3,79                     | D                  |
| 82     | 111                   | celulite             | 2,76                     | B1                 |
| 83     | 112                   | celulite             | 3,14                     | D                  |
| 84     | 116                   | celulite             | 0,40                     | A                  |
| 85     | 117                   | celulite             | 0,40                     | A                  |
| 86     | 120                   | cama aviária         | 0,10                     | A                  |
| 87     | 121                   | celulite             | 1,93                     | A                  |
| 88     | 123                   | celulite             | 0,30                     | B2                 |
| 89     | 124                   | celulite             | 0,90                     | B1                 |
| 90     | 125                   | celulite             | 2,69                     | A                  |
| 91     | 126                   | celulite             | 6,94                     | B2                 |
| 92     | 127                   | celulite             | 2,04                     | D                  |
| 93     | 128                   | celulite             | 0,56                     | A                  |
| 94     | 129                   | cama aviária         | 0,20                     | B2                 |
| 95     | 130                   | celulite             | 4,21                     | D                  |
| 96     | 131                   | celulite             | 0,30                     | D                  |
| 97     | 133                   | celulite             | 0,00                     | A                  |
| 98     | 134                   | cama aviária         | 0,60                     | D                  |
| 99     | 135                   | celulite             | 0,20                     | B1                 |
| 100    | 136                   | celulite             | 4,57                     | B1                 |
| 101    | 140                   | cama aviária         | 1,66                     | D                  |
| 102    | 141                   | celulite             | 1,40                     | A                  |
| 103    | 142                   | celulite             | 2,23                     | B1                 |
| 104    | 143                   | cama aviária         | 0,00                     | A                  |
| 105    | 144                   | celulite             | 7,51                     | D                  |
| 106    | 145                   | celulite             | 8,59                     | D                  |
| 107    | 146                   | celulite             | 0,00                     | B2                 |
| 108    | 148                   | cama aviária         | 0,00                     | A                  |

APÊNDICE A – Origem, índice de patogenicidade e grupo filogenético das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

(continuação)

| Número | Identificação da cepa | Origem de isolamento | Índice de Patogenicidade | Grupo Filogenético |
|--------|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
| 109    | 149                   | celulite             | 7,61                     | B2                 |
| 110    | 150                   | celulite             | 7,27                     | B2                 |
| 111    | 152                   | celulite             | 3,33                     | B1                 |
| 112    | 155                   | celulite             | 0,69                     | A                  |
| 113    | 157                   | celulite             | 0,60                     | D                  |
| 114    | 158                   | cama aviária         | 0,00                     | B2                 |
| 115    | 159                   | celulite             | 0,60                     | A                  |
| 116    | 160                   | celulite             | 0,39                     | A                  |
| 117    | 162                   | celulite             | 1,11                     | D                  |
| 118    | 163                   | cama aviária         | 1,80                     | A                  |
| 119    | 165                   | celulite             | 0,56                     | A                  |
| 120    | 166                   | celulite             | 2,04                     | B2                 |
| 121    | 169                   | celulite             | 1,91                     | B2                 |
| 122    | 170                   | celulite             | 4,16                     | A                  |
| 123    | 172                   | celulite             | 0,94                     | B2                 |
| 124    | 173                   | celulite             | 6,87                     | B2                 |
| 125    | 174                   | celulite             | 2,99                     | A                  |
| 126    | 175                   | celulite             | 0,70                     | B1                 |
| 127    | 176                   | celulite             | 1,40                     | B2                 |
| 128    | 177                   | cama aviária         | 0,50                     | B1                 |
| 129    | 178                   | cama aviária         | 0,40                     | A                  |
| 130    | 179                   | celulite             | 1,70                     | B1                 |
| 131    | 180                   | celulite             | 7,63                     | B1                 |
| 132    | 181                   | celulite             | 7,97                     | B2                 |
| 133    | 182                   | celulite             | 1,33                     | B1                 |
| 134    | 183                   | cama aviária         | 2,87                     | D                  |
| 135    | 184                   | cama aviária         | 1,17                     | B1                 |
| 136    | 185                   | celulite             | 6,67                     | B2                 |
| 137    | 186                   | celulite             | 5,70                     | D                  |
| 138    | 187                   | celulite             | 7,13                     | B2                 |
| 139    | 190                   | cama aviária         | 0,10                     | A                  |
| 140    | 191                   | celulite             | 0,99                     | D                  |
| 141    | 192                   | celulite             | 6,53                     | D                  |
| 142    | 193                   | cama aviária         | 3,71                     | A                  |
| 143    | 194                   | cama aviária         | 2,87                     | A                  |
| 144    | 195                   | celulite             | 5,11                     | B2                 |
| 145    | 196                   | celulite             | 8,89                     | D                  |

APÊNDICE A – Origem, índice de patogenicidade e grupo filogenético das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

(continuação)

| Número | Identificação da cepa | Origem de isolamento | Índice de Patogenicidade | Grupo Filogenético |
|--------|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
| 146    | 197                   | celulite             | 6,93                     | D                  |
| 147    | 198                   | celulite             | 10,00                    | D                  |
| 148    | 204                   | cama aviária         | 0,39                     | B1                 |
| 149    | 205                   | cama aviária         | 0,69                     | B1                 |
| 150    | 206                   | celulite             | 0,49                     | A                  |
| 151    | 207                   | celulite             | 7,50                     | B2                 |
| 152    | 211                   | celulite             | 0,91                     | B1                 |
| 153    | 212                   | celulite             | 6,29                     | D                  |
| 154    | 213                   | celulite             | 3,10                     | B1                 |
| 155    | 214                   | celulite             | 4,09                     | B1                 |
| 156    | 215                   | cama aviária         | 5,54                     | B1                 |
| 157    | 216                   | cama aviária         | 0,39                     | A                  |
| 158    | 217                   | celulite             | 4,99                     | B2                 |
| 159    | 218                   | celulite             | 3,16                     | B2                 |
| 160    | 222                   | celulite             | 6,26                     | B1                 |
| 161    | 223                   | celulite             | 9,29                     | B1                 |
| 162    | 224                   | celulite             | 7,81                     | D                  |
| 163    | 225                   | celulite             | 1,61                     | D                  |
| 164    | 226                   | cama aviária         | 1,90                     | B1                 |
| 165    | 227                   | celulite             | 9,53                     | B1                 |
| 166    | 230                   | cama aviária         | 9,53                     | A                  |
| 167    | 238                   | celulite             | 7,71                     | B1                 |
| 168    | 240                   | celulite             | 6,41                     | B1                 |
| 169    | 241                   | cama aviária         | 8,63                     | B2                 |
| 170    | 245                   | celulite             | 3,43                     | B2                 |
| 171    | 246                   | celulite             | 1,29                     | B1                 |
| 172    | 247                   | cama aviária         | 0,00                     | A                  |
| 173    | 248                   | cama aviária         | 1,59                     | B1                 |
| 174    | 251                   | celulite             | 1,63                     | B1                 |
| 175    | 254                   | cama aviária         | 3,76                     | A                  |
| 176    | 255                   | cama aviária         | 1,21                     | A                  |
| 177    | 256                   | cama aviária         | 1,07                     | B1                 |
| 178    | 257                   | sem origem           | 4,01                     | D                  |
| 179    | 263                   | celulite             | 7,71                     | B1                 |
| 180    | 264                   | celulite             | 3,21                     | B1                 |
| 181    | 258                   | sem origem           | 1,79                     | D                  |
| 182    | 259                   | celulite             | 1,03                     | B1                 |



APÊNDICE A – Origem, índice de patogenicidade e grupo filogenético das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

(continuação)

| Número | Identificação da cepa | Origem de isolamento | Índice de patogenicidade | Grupo filogenético |
|--------|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
| 183    | 265                   | celulite             | 1,20                     | A                  |
| 184    | 268                   | cama aviária         | 9,49                     | A                  |
| 185    | 269                   | celulite             | 3,14                     | B1                 |
| 186    | 272                   | celulite             | 3,29                     | D                  |
| 187    | 274                   | celulite             | 0,96                     | B1                 |
| 188    | 276                   | sem origem           | 1,99                     | A                  |
| 189    | 277                   | celulite             | 6,71                     | D                  |
| 190    | 281                   | cama aviária         | 5,83                     | D                  |
| 191    | 282                   | celulite             | 8,81                     | B2                 |
| 192    | 283                   | celulite             | 9,63                     | B2                 |
| 193    | 284                   | celulite             | 1,16                     | A                  |
| 194    | 285                   | celulite             | 0,79                     | D                  |
| 195    | 287                   | cama aviária         | 7,33                     | D                  |
| 196    | 288                   | celulite             | 1,01                     | A                  |
| 197    | 289                   | celulite             | 4,96                     | B1                 |
| 198    | 296                   | cama aviária         | 0,20                     | D                  |
| 199    | 297                   | cama aviária         | 3,90                     | A                  |
| 200    | 298                   | cama aviária         | 0,49                     | A                  |
| 201    | 302                   | cama aviária         | 1,48                     | A                  |
| 202    | 306                   | cama aviária         | 1,74                     | B1                 |
| 203    | 312                   | celulite             | 2,16                     | A                  |
| 204    | 314                   | cama aviária         | 3,60                     | D                  |
| 205    | 318                   | cama aviária         | 3,84                     | D                  |
| 206    | 1R                    | respiratória         | 2,54                     | A                  |
| 207    | 2R                    | respiratória         | 8,96                     | D                  |
| 208    | 3R                    | respiratória         | 1,39                     | A                  |
| 209    | 4R                    | respiratória         | 10,00                    | B1                 |
| 210    | 5R                    | respiratória         | 3,66                     | B1                 |
| 211    | 6R                    | respiratória         | 5,50                     | D                  |
| 212    | 7R                    | respiratória         | 6,46                     | D                  |
| 213    | 8R                    | respiratória         | 7,34                     | D                  |
| 214    | 9R                    | respiratória         | 3,16                     | B1                 |
| 215    | 10R                   | respiratória         | 4,41                     | D                  |
| 216    | 12R                   | respiratória         | 4,83                     | B2                 |
| 217    | 13R                   | respiratória         | 8,64                     | B2                 |
| 218    | 14R                   | respiratória         | 1,93                     | B2                 |
| 219    | 15R                   | respiratória         | 0,91                     | B2                 |

APÊNDICE A – Origem, índice de patogenicidade e grupo filogenético das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

(continuação)

| Número | Identificação da cepa | Origem de isolamento | Índice de patogenicidade | Grupo filogenético |
|--------|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
| 220    | 19R                   | respiratória         | 9,09                     | B2                 |
| 221    | 20R                   | respiratória         | 6,29                     | A                  |
| 222    | 21R                   | respiratória         | 3,87                     | B2                 |
| 223    | 22R                   | respiratória         | 6,23                     | A                  |
| 224    | 23R                   | respiratória         | 6,60                     | B1                 |
| 225    | 24R                   | respiratória         | 6,60                     | B1                 |
| 226    | 25R                   | respiratória         | 1,84                     | B1                 |
| 227    | 26R                   | respiratória         | 4,80                     | D                  |
| 228    | 27R                   | respiratória         | 3,19                     | D                  |
| 229    | 28R                   | respiratória         | 2,97                     | B1                 |
| 230    | 31R                   | respiratória         | 0,77                     | A                  |
| 231    | 33R                   | respiratória         | 0,59                     | D                  |
| 232    | 34R                   | respiratória         | 7,53                     | B2                 |
| 233    | 35R                   | respiratória         | 1,90                     | B2                 |
| 234    | 36R                   | respiratória         | 6,74                     | D                  |
| 235    | 37R                   | respiratória         | 9,73                     | D                  |
| 236    | 38R                   | respiratória         | 3,63                     | B1                 |
| 237    | 39R                   | respiratória         | 1,40                     | B1                 |
| 238    | 40R                   | respiratória         | 7,77                     | B1                 |
| 239    | 42R                   | respiratória         | 6,56                     | D                  |
| 240    | 43R                   | respiratória         | 9,36                     | B2                 |
| 241    | 44R                   | respiratória         | 6,21                     | D                  |
| 242    | 45R                   | respiratória         | 10,00                    | B2                 |
| 243    | 46R                   | respiratória         | 9,09                     | B2                 |
| 244    | 49R                   | respiratória         | 4,10                     | B1                 |
| 245    | 50R                   | respiratória         | 8,16                     | D                  |
| 246    | 51R                   | respiratória         | 8,11                     | A                  |
| 247    | 52R                   | respiratória         | 9,63                     | B2                 |
| 248    | 53R                   | respiratória         | 1,73                     | D                  |
| 249    | 54R                   | respiratória         | 1,44                     | B1                 |
| 250    | 55R                   | respiratória         | 0,99                     | D                  |
| 251    | 58R                   | respiratória         | 6,03                     | B1                 |
| 252    | 59R                   | respiratória         | 7,18                     | B2                 |
| 246    | 51R                   | respiratória         | 8,11                     | A                  |
| 247    | 52R                   | respiratória         | 9,63                     | B2                 |
| 248    | 53R                   | respiratória         | 1,73                     | D                  |
| 249    | 54R                   | respiratória         | 1,44                     | B1                 |

APÊNDICE A – Origem, índice de patogenicidade e grupo filogenético das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

(continuação)

| Número | Identificação da cepa | Origem de isolamento | Índice de patogenicidade | Grupo filogenético |
|--------|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
| 250    | 55R                   | respiratória         | 0,99                     | D                  |
| 251    | 58R                   | respiratória         | 6,03                     | B1                 |
| 252    | 59R                   | respiratória         | 7,18                     | B2                 |
| 253    | 60R                   | respiratória         | 5,83                     | B1                 |
| 254    | 61R                   | respiratória         | 9,41                     | B1                 |
| 255    | 62R                   | respiratória         | 7,94                     | D                  |
| 256    | 63R                   | respiratória         | 9,63                     | B1                 |
| 257    | 64R                   | respiratória         | 2,73                     | D                  |
| 258    | CC 009                | celulite             | 8,145                    | B1                 |
| 259    | CC 011                | celulite             | 5,973                    | B1                 |
| 260    | CC 012                | celulite             | 4,589                    | B1                 |
| 261    | CC 016                | celulite             | 9,629                    | B1                 |
| 262    | CC 018                | celulite             | 8,245                    | B1                 |
| 263    | CC 019                | celulite             | 4,6                      | B1                 |
| 264    | CC 021                | celulite             | 8,545                    | B1                 |
| 265    | CC 024                | celulite             | 6,903                    | B1                 |
| 266    | CC 037                | celulite             | 7,014                    | D                  |
| 267    | CC 038                | celulite             | 8,274                    | B1                 |
| 268    | CC 039                | celulite             | 8,587                    | B2                 |
| 269    | CC 044                | celulite             | 8,987                    | B2                 |
| 270    | CC 045                | celulite             | 9,487                    | B2                 |
| 271    | CC 047                | celulite             | 7,059                    | D                  |
| 272    | CC 050                | celulite             | 9,46                     | D                  |
| 273    | CC 051                | celulite             | 8,04                     | D                  |
| 274    | CC 052                | celulite             | 6,54                     | B1                 |
| 275    | CC 053                | celulite             | 6,68                     | B1                 |
| 276    | CC 054                | celulite             | 10                       | B2                 |
| 277    | CC 055                | celulite             | 7,34                     | B1                 |
| 278    | CC 056                | celulite             | 8,41                     | B2                 |
| 279    | CC 057                | celulite             | 8,78                     | B2                 |
| 280    | CC 058                | celulite             | 9,46                     | A                  |
| 281    | CC 059                | celulite             | 8,81                     | B2                 |
| 282    | CC 061                | celulite             | 8,3                      | D                  |
| 283    | CC 062                | celulite             | 8,5                      | D                  |
| 284    | CC 063                | celulite             | 9,73                     | A                  |
| 285    | CC 064                | celulite             | 9,05                     | B2                 |
| 286    | CC 065                | celulite             | 8,33                     | B2                 |

APÊNDICE A – Origem, índice de patogenicidade e grupo filogenético das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

(continuação)

| Número | Identificação da cepa | Origem de isolamento | Índice de patogenicidade | Grupo filogenético |
|--------|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
| 287    | CC 066                | celulite             | 8,24                     | B2                 |
| 288    | CC 067                | celulite             | 9,16                     | B1                 |
| 289    | CC 070                | celulite             | 7,99                     | D                  |
| 290    | CC 071                | celulite             | 6,84                     | D                  |
| 291    | CC 072                | celulite             | 8,13                     | D                  |
| 292    | CC 073                | celulite             | 10                       | B2                 |
| 293    | CC 074                | celulite             | 9,08                     | B2                 |
| 294    | CC 075                | celulite             | 9,63                     | B2                 |
| 295    | CC 076                | celulite             | 9,26                     | D                  |
| 296    | CC 077                | celulite             | 9,36                     | B2                 |
| 297    | CC 078                | celulite             | 9,01                     | A                  |
| 298    | CC 079                | celulite             | 8,41                     | D                  |
| 299    | CC 080                | celulite             | 8,68                     | B2                 |
| 300    | CC 081                | celulite             | 9,53                     | B2                 |
| 301    | CC 082                | celulite             | 8,57                     | D                  |
| 302    | CC 083                | celulite             | 7,73                     | A                  |
| 303    | CC 084                | celulite             | 7,6                      | D                  |
| 304    | CC 085                | celulite             | 10                       | B2                 |
| 305    | CC 086                | celulite             | 7,06                     | B1                 |
| 306    | CC 087                | celulite             | 6,04                     | D                  |
| 307    | CC 088                | celulite             | 6,89                     | A                  |
| 308    | CC 089                | celulite             | 6,74                     | D                  |
| 309    | CC 090                | celulite             | 4,28                     | D                  |
| 310    | CC 091                | celulite             | 7,67                     | A                  |
| 311    | CC 092                | celulite             | 7,19                     | D                  |
| 312    | CC 093                | celulite             | 4,27                     | D                  |
| 313    | CC 094                | celulite             | 6,73                     | B2                 |
| 314    | CC 095                | celulite             | 9,63                     | B2                 |
| 315    | CC 096                | celulite             | 9,18                     | A                  |
| 316    | CC 097                | celulite             | 4,41                     | D                  |
| 317    | CC 098                | celulite             | 9,73                     | D                  |
| 318    | CC 099                | celulite             | 6,93                     | B1                 |
| 319    | CC 100                | celulite             | 6,63                     | D                  |
| 320    | CC 101                | celulite             | 7,67                     | D                  |
| 321    | CC 103                | celulite             | 8,68                     | A                  |
| 322    | CC 104                | celulite             | 7,44                     | A                  |

APÊNDICE A – Origem, índice de patogenicidade e grupo filogenético das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

(continuação)

| Número | Identificação da cepa | Origem de isolamento | Índice de patogenicidade | Grupo filogenético |
|--------|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
| 323    | CC 105                | celulite             | 7,34                     | D                  |
| 324    | CC 106                | celulite             | 7,54                     | D                  |
| 325    | CC 107                | celulite             | 1,71                     | B2                 |
| 326    | CC 108                | celulite             | 9,63                     | B2                 |
| 327    | CC 109                | celulite             | 7,34                     | A                  |
| 328    | CC 110                | celulite             | 9,05                     | D                  |
| 329    | CC 111                | celulite             | 8,67                     | B2                 |
| 330    | CC 112                | celulite             | 8,54                     | D                  |
| 331    | CC 113                | celulite             | 8,81                     | B2                 |
| 332    | CC 114                | celulite             | 8,81                     | B2                 |
| 333    | CC 115                | celulite             | 9,56                     | B2                 |
| 334    | CC 116                | celulite             | 9,01                     | A                  |
| 335    | CC 118                | celulite             | 8,4                      | D                  |
| 336    | CC 119                | celulite             | 9,13                     | A                  |
| 337    | CC 120                | celulite             | 10                       | B2                 |
| 338    | CC 121                | celulite             | 9,65                     | D                  |
| 339    | CC 122                | celulite             | 6,33                     | D                  |
| 340    | CC 123                | celulite             | 8,81                     | D                  |
| 341    | CC 124                | celulite             | 8,24                     | B2                 |
| 342    | CC 125                | celulite             | 9,2                      | B2                 |
| 343    | CC 126                | celulite             | 8,36                     | B2                 |
| 344    | CC 127                | celulite             | 0,3                      | B1                 |
| 345    | CC 128                | celulite             | 10                       | D                  |
| 346    | CC 129                | celulite             | 8,46                     | A                  |
| 347    | CC 130                | celulite             | 1                        | B1                 |
| 348    | CC 131                | celulite             | 8,37                     | B2                 |
| 349    | CC 132                | celulite             | 0,4                      | D                  |
| 350    | CC 133                | celulite             | 1,2                      | B1                 |
| 351    | CC 134                | celulite             | 9,66                     | B2                 |
| 352    | CC 135                | celulite             | 8,01                     | A                  |
| 353    | CC 136                | celulite             | 7,39                     | A                  |
| 354    | CC 137                | celulite             | 5,26                     | D                  |
| 355    | CC 138                | celulite             | 5,79                     | D                  |
| 356    | CC 139                | celulite             | 0,2                      | D                  |
| 357    | CC 140                | celulite             | 9,93                     | B1                 |
| 358    | CC 141                | celulite             | 8,46                     | B2                 |

APÊNDICE A – Origem, índice de patogenicidade e grupo filogenético das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

(continuação)

| Número | Identificação da cepa | Origem de isolamento | Índice de patogenicidade | Grupo filogenético |
|--------|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
| 359    | CC 142                | celulite             | 9,41                     | B2                 |
| 360    | CC 143                | celulite             | 0,5                      | D                  |
| 361    | CC 144                | celulite             | 1,3                      | A                  |
| 362    | CC 145                | celulite             | 5,48                     | D                  |
| 363    | CC 146                | celulite             | 7,33                     | D                  |
| 364    | CC 147                | celulite             | 6,81                     | A                  |
| 365    | CC 148                | celulite             | 8,66                     | B1                 |
| 366    | CC 149                | celulite             | 8,34                     | A                  |
| 367    | CC 150                | celulite             | 7,84                     | B2                 |
| 368    | CC 151                | celulite             | 8,44                     | B2                 |
| 369    | CC 152                | celulite             | 5,6                      | B2                 |
| 370    | CC 153                | celulite             | 1,14                     | A                  |
| 371    | CC 154                | celulite             | 3,38                     | D                  |
| 372    | CC 155                | celulite             | 9,46                     | B2                 |
| 373    | CC 156                | celulite             | 9,63                     | B2                 |
| 374    | CC 157                | celulite             | 8,71                     | B2                 |
| 375    | CC 158                | celulite             | 9,11                     | B2                 |
| 376    | CC 159                | celulite             | 9,16                     | B2                 |
| 377    | CC 160                | celulite             | 9,1                      | B1                 |
| 378    | CC 161                | celulite             | 9,63                     | D                  |
| 379    | CC 162                | celulite             | 10                       | B2                 |
| 380    | CC 163                | celulite             | 10                       | A                  |
| 381    | CC 164                | celulite             | 7,43                     | B1                 |
| 382    | CC 165                | celulite             | 6,78                     | B2                 |
| 383    | CC 166                | celulite             | 0,7                      | D                  |
| 384    | CC 167                | celulite             | 6,63                     | A                  |
| 385    | CC 168                | celulite             | 8,88                     | B2                 |
| 386    | CC 169                | celulite             | 8,73                     | B2                 |
| 387    | CC 170                | celulite             | 9,13                     | B2                 |
| 388    | CC 171                | celulite             | 1,38                     | D                  |
| 389    | CC 173                | celulite             | 5,39                     | A                  |
| 390    | CC 174                | celulite             | 8,36                     | B1                 |
| 391    | CC 175                | celulite             | 8,44                     | B1                 |
| 392    | CC 176                | celulite             | 2,81                     | B1                 |
| 393    | CC 177                | celulite             | 8                        | D                  |
| 394    | CC 178                | celulite             | 7,63                     | A                  |

APÊNDICE A – Origem, índice de patogenicidade e grupo filogenético das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

(continuação)

| Número | Identificação da cepa | Origem de isolamento | Índice de patogenicidade | Grupo filogenético |
|--------|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
| 395    | CC 179                | celulite             | 6,44                     | A                  |
| 396    | CC 180                | celulite             | 1                        | B2                 |
| 397    | CC 181                | celulite             | 0,4                      | A                  |
| 398    | CC 182                | celulite             | 9,36                     | D                  |
| 399    | CC183                 | celulite             | 5,08                     | D                  |
| 400    | CC184                 | celulite             | 6,91                     | B2                 |
| 401    | CC185                 | celulite             | 8,71                     | B2                 |
| 402    | CC186                 | celulite             | 9,36                     | B2                 |
| 403    | CC187                 | celulite             | 8,94                     | B1                 |
| 404    | CC188                 | celulite             | 9,34                     | D                  |
| 405    | CC189                 | celulite             | 6,33                     | B2                 |
| 406    | CC190                 | celulite             | 5,71                     | B2                 |
| 407    | CC 191                | celulite             | 5,51                     | B2                 |
| 408    | CC 192                | celulite             | 5,89                     | B2                 |
| 409    | CC 193                | celulite             | 7,83                     | B2                 |
| 410    | CC 194                | celulite             | 6,04                     | B2                 |
| 411    | CC 195                | celulite             | 7,5                      | D                  |
| 412    | CC 196                | celulite             | 5,07                     | D                  |
| 413    | CC 197                | celulite             | 7,98                     | B2                 |
| 414    | CC 198                | celulite             | 8,1                      | B2                 |
| 415    | CC 199                | celulite             | 8,64                     | A                  |
| 416    | CC 200                | celulite             | 5,3                      | A                  |
| 417    | CC 201 A              | celulite             | 7,91                     | B2                 |
| 418    | CC 202                | celulite             | 5,41                     | D                  |
| 419    | CC 203                | celulite             | 6,37                     | A                  |
| 420    | CC 204                | celulite             | 5,25                     | D                  |
| 421    | CC 205                | celulite             | 5,01                     | B2                 |
| 422    | CC 206                | celulite             | 9,73                     | B2                 |
| 423    | CC 207                | celulite             | 8,61                     | B2                 |
| 424    | CC 208                | celulite             | 8,98                     | B2                 |
| 425    | CC 209                | celulite             | 8,35                     | A                  |
| 426    | CC 210                | celulite             | 8,88                     | B2                 |
| 427    | CC 211                | celulite             | 7,45                     | D                  |
| 428    | CC 212                | celulite             | 8,64                     | A                  |
| 429    | CC 213                | celulite             | 6,88                     | B1                 |
| 430    | CC 214                | celulite             | 6,73                     | D                  |

APÊNDICE A – Origem, índice de patogenicidade e grupo filogenético das 460 cepas de *Escherichia coli* APEC.

(conclusão)

| Número | Identificação das cepas | Origem de isolamento | Índice de patogenicidade | Grupo filogenético |
|--------|-------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
| 431    | CC 215                  | celulite             | 8,33                     | B2                 |
| 432    | CC 216                  | celulite             | 6,05                     | B2                 |
| 433    | CC 217                  | celulite             | 0,97                     | B1                 |
| 434    | CC 218                  | celulite             | 4,98                     | D                  |
| 435    | CC 219                  | celulite             | 2,38                     | D                  |
| 436    | CC 220                  | celulite             | 6,73                     | B2                 |
| 437    | CC 221                  | celulite             | 8,1                      | D                  |
| 438    | CC 222                  | celulite             | 6,36                     | B2                 |
| 439    | CC 223                  | celulite             | 6,7                      | B2                 |
| 440    | CC 224                  | celulite             | 7,88                     | B2                 |
| 441    | CC 225                  | celulite             | 9,36                     | D                  |
| 442    | CC 226                  | celulite             | 7,68                     | B2                 |
| 443    | CC 227                  | celulite             | 6,98                     | A                  |
| 444    | CC 228                  | celulite             | 7,77                     | B2                 |
| 445    | CC 229                  | celulite             | 6,61                     | D                  |
| 446    | CC 230                  | celulite             | 7,53                     | D                  |
| 447    | CC 231                  | celulite             | 3,34                     | B2                 |
| 448    | CC 232                  | celulite             | 8                        | B2                 |
| 449    | CC 233                  | celulite             | 10                       | D                  |
| 450    | CC 234                  | celulite             | 7,53                     | D                  |
| 451    | CC 235                  | celulite             | 3,28                     | D                  |
| 452    | CC 236                  | celulite             | 3,89                     | D                  |
| 453    | CC 237                  | celulite             | 9,73                     | B1                 |
| 454    | CC 238                  | celulite             | 4,58                     | B1                 |
| 455    | CC 239                  | celulite             | 4,64                     | A                  |
| 456    | CC 240                  | celulite             | 5,88                     | D                  |
| 457    | CC 241                  | celulite             | 6,85                     | D                  |
| 458    | CC 242                  | celulite             | 5,28                     | D                  |
| 459    | CC 243                  | celulite             | 5,15                     | D                  |
| 460    | CC 245                  | celulite             | 7,69                     | B1                 |



APÊNDICE B – Gênero do paciente, origem e grupo filogenético das 450 cepas de *Escherichia coli* UPEC.

(continuação)

| Número | Identificação protocolo | Gênero do paciente | Origem de isolamento | Grupo Filogenético |
|--------|-------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| 1      | -                       | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 2      | -                       | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 3      | 11350725                | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 4      | -                       | -                  | infecção urinária    | D                  |
| 5      | 5117023                 | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 6      | 4260337                 | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 7      | 7832421                 | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 8      | 90942566                | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 9      | 11756699                | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 10     | 8431918                 | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 11     | 10104131                | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 12     | 9383332                 | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 13     | 11694502                | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 14     | -                       | -                  | infecção urinária    | D                  |
| 15     | 11691516                | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 16     | 10198398                | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 17     | 7019300                 | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 18     | 90944785                | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 19     | 9815614                 | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 20     | -                       | -                  | infecção urinária    | D                  |
| 21     | 11633542                | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 22     | -                       | -                  | infecção urinária    | D                  |
| 23     | 10648251                | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 24     | 90944489                | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 25     | 90942921                | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 26     | -                       | -                  | infecção urinária    | D                  |
| 27     | 4523481                 | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 28     | 8911505                 | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 29     | 11729027                | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 30     |                         | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 31     | 11737053                | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 32     | 11744117                | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 33     | -                       | -                  | infecção urinária    | A                  |
| 34     | 10975456                | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 35     | -                       | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 36     | 9893306                 | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 37     | 11082443                | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 38     | 11157773                | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 39     | 481648                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 40     | 11061470                | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 41     | 7075401                 | F                  | infecção urinária    | B2                 |

APÊNDICE B – Gênero do paciente, origem e grupo filogenético das 450 cepas de *Escherichia coli* UPEC.

(continuação)

| Número | Identificação do protocolo | Gênero do paciente | Origem de isolamento | Grupo filogenético |
|--------|----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| 42     | 6783781                    | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 43     | 3475837                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 44     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 45     | 11411741                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 46     | 9503335                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 47     | 1124379                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 48     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 49     | 9771288                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 50     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 51     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 52     | 9701475                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 53     | 1504315                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 54     | 1113554                    | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 55     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 56     | 11747052                   | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 57     | 3786159                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 58     | 3624657                    | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 59     | 11528346                   | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 60     | -                          | -                  | infecção urinária    | A                  |
| 61     | 11668514                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 62     | 1,16E+08                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 63     | 11747052                   | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 64     | 8680449                    | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 65     | 3757474                    | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 66     | -                          | -                  | infecção urinária    | A                  |
| 67     | 11712627                   | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 68     | 7507411                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 69     | -                          | -                  | infecção urinária    | D                  |
| 70     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 71     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 72     | 9107889                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 73     | 9318957                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 74     | 11630712                   | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 75     | -                          | -                  | infecção urinária    | D                  |
| 76     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 77     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 78     | 4426319                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 79     | 11649209                   | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 80     | 1068782                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 81     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 82     | -                          | -                  | infecção urinária    | A                  |

APÊNDICE B – Gênero do paciente, origem e grupo filogenético das 450 cepas de *Escherichia coli* UPEC.

(continuação)

| Número | Identificação do protocolo | Gênero do paciente | Origem de isolamento | Grupo filogenético |
|--------|----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| 83     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 84     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 85     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 86     | 11753209                   | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 87     | -                          | -                  | infecção urinária    | A                  |
| 88     | -                          | -                  | infecção urinária    | A                  |
| 89     | -                          | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 90     | 11368388                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 91     | 4172219                    | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 92     | 10853281                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 93     | 10529907                   | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 94     | 11358264                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 95     | 6811293                    | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 96     | 11521812                   | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 97     | 125443                     | M                  | infecção urinária    | A                  |
| 98     | 12369286                   | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 99     | 8332728                    | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 100    | 4419859                    | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 101    | 6710487                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 102    | 8410664                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 103    | 4111233                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 104    | 2474682                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 105    | 5584818                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 106    | 4608162                    | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 107    | 9915141                    | M                  | infecção urinária    | A                  |
| 108    | 9331000                    | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 109    | 11662467                   | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 110    | 11896800                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 111    | 5764287                    | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 112    | 8602716                    | -                  | infecção urinária    | D                  |
| 113    | 10058857                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 114    | 10872877                   | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 115    | 8119703                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 116    | 5332689                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 117    | 12020020                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 118    | 5395835                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 119    | 8132680                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 120    | 12298444                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 121    | 11138179                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 122    | 12295978                   | M                  | infecção urinária    | A                  |
| 123    | 1076470                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |

APÊNDICE B – Gênero do paciente, origem e grupo filogenético das 450 cepas de *Escherichia coli* UPEC.

(continuação)

| Número | Identificação do protocolo | Gênero do paciente | Origem de isolamento | Grupo filogenético |
|--------|----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| 124    | 6446181                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 125    | 12287751                   | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 126    | 91320614                   | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 127    | 11908720                   | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 128    | 11639440                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 129    | 12099529                   | M                  | infecção urinária    | A                  |
| 130    | 11930971                   | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 131    | 11783768                   | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 132    | 10212132                   | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 133    | -                          | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 134    | 11508165                   | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 135    | 2725513                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 136    | 12377693                   | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 137    | 11123726                   | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 138    | 12200788                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 139    | 12212841                   | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 140    | 12343471                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 141    | 11852803                   | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 142    | 7987456                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 143    | -                          | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 144    | 10534048                   | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 145    | 11069077                   | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 146    | 12386660                   | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 147    | 7937022                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 148    | 11852803                   | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 149    | 8042616                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 150    | 11952355                   | M                  | infecção urinária    | B1                 |
| 151    | 11199072                   | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 152    | 9847062                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 153    | 12157343                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 154    | 11462231                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 155    | 11601655                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 156    | 12053237                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 157    | 8198152                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 158    | 10010569                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 159    | 12395067                   | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 160    | 9626896                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 161    | 8803876                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 162    | 91322016                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 163    | 1067214                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 164    | 10108058                   | M                  | infecção urinária    | B2                 |

APÊNDICE B – Gênero do paciente, origem e grupo filogenético das 450 cepas de *Escherichia coli* UPEC.

(continuação)

| Número | Identificação do protocolo | Gênero do paciente | Origem de isolamento | Grupo filogenético |
|--------|----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| 165    | 725606                     | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 166    | 5708367                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 167    | 9041757                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 168    | 91323543                   | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 169    | 10507119                   | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 170    | 3463049                    | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 171    | 8891582                    | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 172    | 91326850                   | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 173    | 12145371                   | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 174    | 12404729                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 175    | 12397154                   | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 176    | 12369138                   | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 177    | 12307823                   | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 178    | 9419128                    | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 179    | 91337212                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 180    | 12424313                   | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 181    | 91224469                   | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 182    | 9133715/4                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 183    | 1128694/5                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 184    | 0079677/1                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 185    | 0002716/9                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 186    | 0398905/0                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 187    | 0659027/7                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 188    | 1085858/7                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 189    | 1192025/3                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 190    | 0458221/9                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 191    | 0002716/9                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 192    | 9134645/2                  | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 193    | 0340506/5                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 194    | 1000510/6                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 195    | 9134640/3                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 196    | 9111748/1                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 197    | 0387361/9                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 198    | 1241136/9                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 199    | 0869438/2                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 200    | 1242981/7                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 201    | 0605286/4                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 202    | 1195459/1                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 203    | 1215699/8                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 204    | 0894587/5                  | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 205    | 0917055/6                  | F                  | infecção urinária    | A                  |

APÊNDICE B – Gênero do paciente, origem e grupo filogenético das 450 cepas de *Escherichia coli* UPEC.

(continuação)

| Número | Identificação do protocolo | Gênero do paciente | Origem de isolamento | Grupo filogenético |
|--------|----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| 206    | 0823185/4                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 207    | 0453962/3                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 208    | 0061112/9                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 209    | 1152122/6                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 210    | 1148847/5                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 211    | 0102935/4                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 212    | 0889399/2                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 213    | 0574023/8                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 214    | 1155177/7                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 215    | 0873757/9                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 216    | 0644618/1                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 217    | 0399072/8                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 218    | 0227633/5                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 219    | 0807683/8                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 220    | 0960904/1                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 221    | 1238969/8                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 222    | 0800915/1                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 223    | 0793702/2                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 224    | 0866389/0                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 225    | 0985249/2                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 226    | 1199761/6                  | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 227    | 1154754/4                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 228    | 0960904/1                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 229    | 1112692/7                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 230    | 0917624/9                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 231    | 9124884/9                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 232    | 0681169/9                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 233    | 1077688/8                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 234    | 0305408/7                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 235    | 0520328/6                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 236    | 1030108/3                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 237    | 0874650/5                  | M                  | infecção urinária    | A                  |
| 238    | 0544152/2                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 239    | 0491397/6                  | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 240    | 9037846/4                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 241    | 1244018/6                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 242    | -                          | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 243    | 1205014/2                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 244    | 1199761/6                  | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 245    | 0250827/3                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 246    | 0336970/9                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |

APÊNDICE B – Gênero do paciente, origem e grupo filogenético das 450 cepas de *Escherichia coli* UPEC.

(continuação)

| Número | Identificação do protocolo | Gênero do paciente | Origem de isolamento | Grupo filogenético |
|--------|----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| 247    | 1011066/6                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 248    | 0154225/7                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 249    | 0948441/1                  | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 250    | 0702557/0                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 251    | 0924032/6                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 252    | 0483494/1                  | M                  | infecção urinária    | A                  |
| 253    | 0591049/2                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 254    | 1084393/6                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 255    | 0015680/2                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 256    | 1182236/8                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 257    | 0973102/7                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 258    | 0900133/0                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 259    | 1236913/8                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 260    | 0982211/5                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 261    | 1242709/2                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 262    | 1084275/5                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 263    | 0730186/4                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 264    | 0989650/7                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 265    | 9135281/5                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 266    | 0659027/7                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 267    | 1040256/8                  | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 268    | 1145053/3                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 269    | 0968097/6                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 270    | 1229137/3                  | M                  | infecção urinária    | A                  |
| 271    | 9135329/2                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 272    | 1243802/4                  | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 273    | 0300019/7                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 274    | 0477708/2                  | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 275    | 0318780/4                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 276    | 0272551/3                  | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 277    | 1206485/3                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 278    | 1246720/5                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 279    | 0559025/2                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 280    | 0613748/3                  | M                  | infecção urinária    | B1                 |
| 281    | 0801977/0                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 282    | -                          | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 283    | -                          | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 284    | 1110585/5                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 285    | 0774784/3                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 286    | 0200582/5                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 287    | 1212877/3                  | F                  | infecção urinária    | D                  |

APÊNDICE B – Gênero do paciente, origem e grupo filogenético das 450 cepas de *Escherichia coli* UPEC.

(continuação)

| Número | Identificação do protocolo | Gênero do paciente | Origem de isolamento | Grupo filogenético |
|--------|----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| 288    | 1193774/?                  | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 289    | 1246312/1                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 290    | 1096750/3                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 291    | 1247187/6                  | M                  | infecção urinária    | A                  |
| 292    | 1228717/3                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 293    | 0888285/4                  | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 294    | 1247187/6                  | M                  | infecção urinária    | A                  |
| 295    | 1037998/0                  | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 296    | 0715741/5                  | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 297    | 9136222/8                  | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 298    | 1245975/6                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 299    | 9136283/0                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 300    | 1009124/7                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 301    | 0778386/3                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 302    | 0182648/6                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 303    | 9080420/4                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 304    | 0813268/0                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 306    | 0412407/9                  | M                  | infecção urinária    | B1                 |
| 307    | 0354118/2                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 308    | 0371222/1                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 309    | 115?557/2                  | M                  | infecção urinária    | B1                 |
| 310    | 1246492/1                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 311    | 0778386/3                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 312    | -                          | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 313    | 1247711/3                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 314    | 1235428/8                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 315    | 0776286/7                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 316    | 0411915/2                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 317    | 0631906/5                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 318    | 1142124/5                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 319    | 1241695/4                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 320    | 0002716/9                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 321    | 1056525/7                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 322    | 0310547/5                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 323    | 1233182/3                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 324    | 1241136/9                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 325    | 1084567/5                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 326    | 1070397/3                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 327    | 1031509/1                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 328    | 9136570/0                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 329    | 1147155/4                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |



APÊNDICE B – Gênero do paciente, origem e grupo filogenético das 450 cepas de *Escherichia coli* UPEC.

(continuação)

| Número | Identificação do protocolo | Gênero do paciente | Origem de isolamento | Grupo filogenético |
|--------|----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| 330    | 0154225/7                  | -                  | infecção urinária    | D                  |
| 331    | 0406124/8                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 332    | 1246795/7                  | M                  | infecção urinária    | A                  |
| 333    | 0497266/7                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 334    | 0544152/2                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 335    | 1246253/7                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 336    | 1028433/9                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 337    | 1009037/1                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 338    | 1233460/3                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 339    | 1226890/0                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 340    | 1029766/1                  | -                  | infecção urinária    | D                  |
| 341    | 1247757/6                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 342    | 9087865/3                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 343    | 1248008/3                  | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 344    | 0947687/0                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 345    | 9110071/9                  | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 346    | 1152900/5                  | M                  | infecção urinária    | A                  |
| 347    | 0790302/4                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 348    | 0812495/0                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 349    | 0678658/6                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 350    | 1218474/3                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 351    | 1247488/8                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 352    | -                          | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 353    | 1236581/3                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 354    | 0675719/9                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 355    | 9136809/2                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 356    | 117006/4                   | M                  | infecção urinária    | B1                 |
| 357    | 095090/9                   | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 358    | 0574087/3                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 359    | 9098748/8                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 360    | 0940236/3                  | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 361    | 0778408/5                  | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 362    | 0284159/1                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 363    | 0398905/0                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 364    | 1065454/9                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 365    | 0443089/8                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 366    | 0659027/7                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 367    | 0979453/8                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 368    | 0868924/2                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 369    | 0905211/9                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 370    | 1248878/9                  | F                  | infecção urinária    | D                  |

APÊNDICE B – Gênero do paciente, origem e grupo filogenético das 450 cepas de *Escherichia coli* UPEC.

(continuação)

| Número | Identificação do protocolo | Gênero do paciente | Origem de isolamento | Grupo filogenético |
|--------|----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| 371    | 1028511/2                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 372    | 0213508/5                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 373    | 0930876/8                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 374    | 0699896/7                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 375    | 1147184/4                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 376    | 0106878/2                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 377    | 0914713/3                  | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 378    | 0007388/2                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 379    | 9137220/1                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 380    | 1228076/4                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 381    | 0677526/6                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 382    | 1243231/6                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 383    | 0898641/6                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 384    | 0033037/3                  | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 385    | 9064798/3                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 386    | 1250947/7                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 387    | 1213964/8                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 388    | 0613748/3                  | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 389    | 0787348/2                  | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 390    | 1148018/3                  | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 391    | 1021515/0                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 392    | 0503098/6                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 393    | 1189133/0                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 394    | 0340506/5                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 395    | 0050254/2                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 396    | 0694920/0                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 397    | 1212485/5                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 398    | 0775559/8                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 399    | 1239697/4                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 400    | 1211989/7                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 401    | 0720360/7                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 402    | 1029661/4                  | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 403    | -                          | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 404    | 0523444/8                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 405    | 1187826/1                  | F                  | infecção urinária    | B1                 |
| 406    | 1223543/8                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 407    | 1218321/6                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 408    | 0801977/0                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 409    | 1202432/9                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 410    | 1153024/3                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 411    | 9138884/3                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |

APÊNDICE B – Gênero do paciente, origem e grupo filogenético das 450 cepas de *Escherichia coli* UPEC.

(conclusão)

| Número | Identificação do protocolo | Gênero do paciente | Origem de isolamento | Grupo filogenético |
|--------|----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| 412    | 9138874/4                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 413    | 1245263/7                  | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 414    | 1233307/6                  | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 415    | 0259617/9                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 416    | 9138891/8                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 417    | 1241063/5                  | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 418    | 0173533/1                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 419    | 0886343/5                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 420    | 0350279/6                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 421    | 9138886/8                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 422    | 1128989/9                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 423    | 1252092/0                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 424    | 9083190/0                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 425    | 1087350/3                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 426    | 1099630/4                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 427    | 0551336/1                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 428    | 1224553/6                  | M                  | infecção urinária    | D                  |
| 429    | 1188099/4                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 430    | 1019659/0                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 431    | 1233189/8                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 432    | 0678658/6                  | F                  | infecção urinária    | D                  |
| 433    | 0022482/4                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 434    | 0951243/5                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 435    | -                          | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 436    | -                          | F                  | infecção urinária    | A                  |
| 437    | 0024225/5                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 438    | 1056145/4                  | -                  | infecção urinária    | A                  |
| 439    | 0750755/1                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 440    | 0460074/8                  | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 441    | 0603558/8                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 442    | 1234024/6                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 443    | 1219667/1                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 444    | 9022333/0                  | -                  | infecção urinária    | B2                 |
| 445    | 1174962/9                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 446    | 1211124/1                  | M                  | infecção urinária    | A                  |
| 447    | 1239065/4                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 448    | 1252324/7                  | F                  | infecção urinária    | B2                 |
| 449    | 0977226/0                  | M                  | infecção urinária    | B2                 |
| 450    | 9139549/1                  | F                  | infecção urinária    | A                  |

ANEXO A – Genes de virulência de *Escherichia coli* selecionados e funções associadas

(continua)

| Número | Gene               | Características   |
|--------|--------------------|---|
| 1      | <i>kpsMT II</i>    | Antígeno cápsular do grupo II   |
| 2      | <i>hlyA</i>        | Hemolisina A  |
| 3      | <i>pic</i>         | Protease Serina Autotransportadora  |
| 4      | <i>fimC</i>        | Fímbria tipo 1 (Adesina D-Manose-Específica)                                    |
| 5      | <i>hra</i>         | Aglutinina resistente ao calor  |
| 6      | <i>iha</i>         | Gene homólogo-ferro-regulado  |
| 7      | <i>neuC</i>        | Polissacarídeo capsular K1  |
| 8      | <i>afa/draB</i>    | Adesina afimbrial / adesina antígeno-específica                                 |
| 9      | <i>malX = Rpai</i> | Ilha de patogenicidade associada ao marcador CFTO 73                            |
| 10     | <i>sfa/focC</i>    | Fímbria S e fímbria F1CD  |
| 11     | <i>chuA</i>        | Gene da proteína Heme (transporte) da EHEC                                      |
| 12     | <i>ibeA</i>        | Proteína de invasão do endotélio cerebral de <i>E. coli</i>                     |
| 13     | <i>traT</i>        | Proteína de transferência   |
| 14     | <i>sitD chr</i>    | Gene do sistema de transporte de ferro da <i>Salmonella spp.</i>                |
| 15     | <i>gimB</i>        | Ilha genética associada com a meningite neonatal                                |
| 16     | <i>ironA</i>       | Catecolatos sideróforos   |
| 17     | <i>ompA</i>        | Proteína da membrana externa  |
| 18     | <i>SitD ep.</i>    | Gene do sistema de transporte de ferro da <i>Salmonella spp.</i>                |
| 19     | <i>astA</i>        | EAST1 (calor estável associado à citotoxina de <i>E. coli</i> enteroagregativa) |
| 20     | <i>iss</i>         | Aumento da sobrevivência sérica   |
| 21     | <i>irp2</i>        | Aerobactina   |
| 22     | <i>papC</i>        | Pilus associado com pielonefrite  |
| 23     | <i>cvi/cva</i>     | Gene estrutural do operon do plasmídeo ColV                                     |
| 24     | <i>iucD</i>        | Aerobactina (Síntese)   |
| 25     | <i>tsh</i>         | Proteína Tsh - Hemaglutinina sensível à temperatura                             |

(conclusão)

| Número | Gene           | Características  |
|--------|----------------|--|
| 26     | <i>vat</i>     | Toxina autotransportadora que induz formação de vacúolos   |
| 27     | <i>crl</i>     | Fímbria “curli” (regurador)                                |
| 28     | <i>ireA</i>    | Elemento ferro-responsivo                                  |
| 29     | <i>cnf1/2</i>  | Fator necrosante citotóxico                                |
| 30     | <i>tia</i>     | Invasão de locus toxigênicos                               |
| 31     | <i>sat</i>     | Toxina autotransportadora secretada                        |
| 32     | <i>fyuA</i>    | Aerobactina  |
| 33     | <i>mat</i>     | Fimbrias associadas à meningite e regulação da temperatura |
| 34     | <i>felA</i>    | Codificadora da fímbria 11                                 |
| 35     | <i>iutA</i>    | Presença de aerobactina: captação e transporte de ferro    |
| 36     | <i>cvaC</i>    | Produção de colicina                                       |
| 37     | <i>papG</i>    | Fímbria P ou F 11  |
| 38     | <i>fimH</i>    | Fímbria do tipo 1  |
| 39     | <i>TspE4C2</i> | Fragmento de DNA anônimo                                   |
| 40     | <i>yjaA</i>    | Genoma de <i>E. coli</i> K12 – função desconhecida         |
| 41     | <i>chuA</i>    | Heme transporte  |

Adaptado de Tejkowski (2013)