

ANDRÉ PEGORARO POOR

**Caracterização de patógenos bacterianos causadores de metrite
em suínos através da cultura e análise metagenômica**

São Paulo

2022

ANDRÉ PEGORARO POOR

**Caracterização de patógenos bacterianos causadores de metrite
em suínos através da cultura e análise metagenômica**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4204
FMVZ

Poor, André Pegoraro
Caracterização de patógenos bacterianos causadores de metrite em suínos através da cultura e análise metagenômica / André Pegoraro Poor. – 2022.
105 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. Metrite. 2. Microbiota. 3. Sequenciamento. 4. MALDI-TOF MS. 5. Suínos. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 08 de julho de 2020
CEUA N 1875170317
(ID 006557)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Andrea Micke Moreno

Área: Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses

Título da proposta: "Identificação e caracterização fenotípica de patógenos bacterianos causadores de metrite em fêmeas suínas."

CERTIFICADO (Emenda versão de 17/junho/2020)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 17/junho/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O aluno passou do programa de mestrado para o Doutorado direto e os prazos foram alterados, sem alteração significativa no projeto de pesquisa. Desta forma a data prevista para a defesa passa a ser maio de 2021."

Nova previsão de término da proposta: **05/2021**

Comentário da CEUA: Foi aprovada a inclusão de outros 500 animais. Lembramos que os TCLEs devidamente assinados devem ser arquivados pelo pesquisador por um período de 5 anos após a conclusão do projeto e mantidos à disposição para consultas desta CEUA ou demais órgãos competentes.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: POOR, André Pegoraro.

Título: **Caracterização de patógenos bacterianos causadores de metrite em suínos através da cultura e análise metagenômica.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, especialmente aos meus pais, Kátia e Rene, e à minha irmã, Mariana, por todo o amor, apoio e torcida. Vocês são a minha fortaleza.

À minha orientadora, Andrea Micke Moreno, pelo imenso carinho, atenção, apoio e esforço que teve comigo durante esses anos; e pela confiança que depositou em mim.

À Luisa Zanolli Moreno, pela amizade, por toda a transmissão de conhecimento e pela excepcional ajuda durante todo o projeto e além dele.

À Vitória Amaral, por todo o apoio incondicional que me proporciona, pelo carinho e pelo companheirismo.

Aos grandes amigos que, não somente durante a pós-graduação, mas durante todo o período na USP, me ajudaram de alguma forma. Sem vocês o caminho teria sido menos alegre: Bruno Muro, Carlos Matajira, Diego Leal, Gabriel Prohaska, Matheus Saliba, Nelson Santana, Rafaella Carnevale.

A todos os amigos do Laboratório de Sanidade Suína: Alexandre Sanches, Dona Rose, Andressa Dalmutt, Jéssica Moreira, Bárbara Peres, Vasco Túlio, Carol Oliveira, Beatriz Parra e em especial à Rosi e à Paula, pela amizade, cumplicidade e ajuda.

Ao Maurício Cabral Dutra, pela ajuda nas visitas às granjas, na coleta de amostras e pela transmissão de conhecimento.

À toda a equipe do VPS, em especial à Vanessa e ao amigo Danival, pelo apoio e prontidão.

A todos os animais que nos cercam e se envolvem em nosso aprendizado. A construção do nosso conhecimento não pode acontecer sem eles. Tratá-los com respeito e de maneira ética é o maior objetivo e o maior legado da nossa profissão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicado às Zoonoses e à Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – (CNPq).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro do projeto (processo nº 2019/01192-7 e 2017/09515-4).

À memória de meu querido tio, Alexandre de Bartolo

Pegoraro.

*“O mundo é mágico: as pessoas não morrem, ficam
encantadas...”*

(João Guimarães Rosa)

RESUMO

POOR, A. P. **Caracterização de patógenos bacterianos causadores de metrite em suínos através da cultura e análise metagenômica** [Identification of bacterial pathogens causing metritis in pigs using culture and metagenomic analysis]. 2022. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2022.

As descargas vulvares e as infecções urogenitais, cujos sinais clínicos mais frequentes incluem a presença de secreção purulenta na região vulvar, falha reprodutiva, inapetência e má condição corporal das fêmeas, provocam graves prejuízos econômicos aos produtores de suínos. No entanto, os agentes etiológicos envolvidos, sua suscetibilidade a antimicrobianos, bem como a população bacteriana residente do trato reprodutivo de fêmeas suínas saudáveis são temas pouco estudados, impedindo uma avaliação crítica dos tratamentos atualmente empregados. Desse modo, os objetivos deste estudo foram isolar e identificar agentes presentes em descargas vulvares purulentas de porcas utilizando a cultura bacteriana tradicional, bem como caracterizar a microbiota vaginal de fêmeas com e sem descarga vulvar, pela metagenômica do gene 16S rRNA. Os isolados de *Escherichia coli* foram avaliados ainda quanto à presença de genes relacionados a infecções extraintestinais (ExPEC). A partir dos 310 animais estudados foi identificada uma ampla variedade de espécies bacterianas em fêmeas com descargas vulvares purulentas e em fêmeas saudáveis. Entre os principais agentes identificados estão *E. coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Trueperella pyogenes*. As estirpes de *E. coli* apresentaram diversos fatores de virulência associados à ExPEC, principalmente, as isoladas de fêmeas com descarga vulvar, e mais de 93% delas foram consideradas multirresistentes. A análise metagenômica revelou predominância de gêneros semelhantes aos identificados pelo MALDI-TOF MS, como *Escherichia-Shigella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, porém revelou outros agentes de potencial patogênico em maior abundância e associados nas fêmeas com descarga vulvar purulenta, como *Bacteroides pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Trueperella pyogenes*.

Palavras-chave: metrite, microbiota, sequenciamento, MALDI-TOF MS, fêmeas suínas.

ABSTRACT

POOR, A. P. **Identification of bacterial pathogens causing metritis in pigs using culture and metagenomic analysis.** [Caracterização de patógenos bacterianos causadores de metrite em suínos através da cultura e análise metagenômica] 2022. 105 p. Thesis (Ph. D) – College of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, 2022.

Vulvar discharges and urogenital infections cause serious economic damage to pig producers, whose most frequent clinical signs include the presence of purulent secretion in the vulvar region, reproductive failure, lack of appetite and poor body condition of the sows. However, the etiological agents involved in these infections, the susceptibility of these agents to antimicrobials, as well as the bacterial population resident in the reproductive tract of swine females are poorly studied, which makes it difficult to critically evaluate the treatments currently employed. Therefore, the objectives of this study were to isolate and identify the agents present in purulent vulvar discharges of sows by traditional bacterial culture, as well as to characterize the vaginal microbiome of sows with and without purulent vulvar discharges, through the metagenomics of the 16SrRNA gene. In addition, *Escherichia coli* isolates were evaluated for the presence of genes related to extraintestinal infections (ExPEC). MALDI-TOF mass spectrometry made it possible to identify a wide variety of bacteria in the reproductive canal of swine females. *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium diphtheriae* and *Trueperella pyogenes* are among the main isolated agents. *Escherichia coli* strains have several of the virulence factors associated with ExPEC, mainly in females with vulvar discharge, and more than 93% of them were considered multidrug resistant. The metagenomic analysis pointed out predominant genera similar to those indicated by MALDI-TOF mass spectrometry, such as *Escherichia-Shigella*, *Streptococcus*, and *Staphylococcus*, but also revealed other agents of pathogenic potential in higher abundance and associated in females with purulent vulvar discharge, such as *Bacteroides pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Trueperella pyogenes*.

Keywords: metritis, microbiome, NGS, MALDI-TOF, sows.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DE PATÓGENOS BACTERIANOS ISOLADOS DE DESCARGA VULVAR PURULENTO EM SUÍNOS: CULTURA, ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF E PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	14
2.1 INTRODUÇÃO.....	14
2.2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.3 OBJETIVOS.....	20
2.4 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.4.1 MATERIAL.....	20
2.4.2 ISOLAMENTO BACTERIANO.....	22
2.4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES POR MALDI-TOF MS.....	24
2.4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS PARA OS PRINCIPAIS AGENTES.....	25
2.4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
2.5 RESULTADOS	26
2.5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	26
2.5.2 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS PARA OS PRINCIPAIS AGENTES ..	38
2.6 DISCUSSÃO.....	44
2.7 CONCLUSÃO	48
3. CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> : FATORES DE VIRULÊNCIA E PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.	50
3.1 INTRODUÇÃO.....	50
3.2 REVISÃO DE LITERATURA	51
3.3 OBJETIVOS.....	54
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	54
3.4.1 EXTRAÇÃO DO DNA E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	54
3.4.2 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS PARA AS ESTIRPES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	56
3.4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
3.5 RESULTADOS	58
3.5.1 PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS A EXPEC	58
3.5.2 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS PARA AS ESTIRPES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	63
3.6 DISCUSSÃO.....	66
3.7 CONCLUSÃO	69
4. CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DO CANAL VAGINAL DE FÊMEAS COM E SEM DESCARGA VULVAR PURULENTO POR MEIO DA METAGENÔMICA DO GENE 16S RRNA.....	70
4.1 INTRODUÇÃO.....	70

4.2	REVISÃO DE LITERATURA	71
4.3	OBJETIVOS.....	73
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	73
4.4.1	EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISE METAGENÔMICA DO GENE 16S RRNA	73
4.4.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA	74
4.5	RESULTADOS	75
4.5.1	SEQUENCIAMENTO	75
4.5.2	ANÁLISE DE DIVERSIDADE ALFA E BETA	75
4.5.3	COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA E ANÁLISE DE ABUNDÂNCIA DIFERENCIAL	79
4.5.4	ANÁLISE DE REDE	85
4.6	DISCUSSÃO.....	87
4.7	CONCLUSÃO	91
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1. Introdução geral

O Brasil ocupa posição de destaque na produção mundial de suínos. Em 2019, pouco mais de 3,9 milhões de toneladas de carne suína foram produzidas em território nacional, das quais 750 mil toneladas (19%) foram destinadas ao mercado externo. Esses índices colocam o Brasil como o 4º maior produtor e exportador de carne suína do mundo (ABPA, 2020).

Em contrapartida, a mortalidade de matrizes suínas tem demandado atenção nos últimos anos e dentre muitas causas, as infecções urogenitais representam uma boa parcela da morte ou do descarte de fêmeas da produção (CHINA SUPAKORN, 2019). Segundo Silveira et al. (2007) a descarga vulvar é um dos principais sinais clínicos dessas infecções, que podem acometer vulva, vagina, cérvix, útero e vias urinárias. É comum, entretanto, que as descargas vulvares se originem no trato reprodutivo, devido às endometrites e metrites. Como consequência, falhas reprodutivas, queda no desempenho e a má condição corporal das fêmeas acometidas frequentemente levam ao descarte desses animais (DIAL; MACLACHION, 1988; KIRKWOOD et al., 2012).

Em suínos, estes processos infecciosos têm grande ligação com fatores ambientais e de manejo (FARNUM; RIESE, 1989); no entanto, seu controle e prevenção é frequentemente realizado pelo uso de antimicrobianos via ração ou injetável (ALTHOUSE; KAUFFOLD; ROSSOW, 2019), e raramente pela correção destes fatores. Nos casos de medicação via ração, as dosagens devem ser elevadas para que o princípio ativo atinja o sítio de atuação e em muitos casos, por falhas no cálculo destas doses, as concentrações teciduais adequadas não são atingidas. Este quadro leva a altos gastos com antimicrobianos e à exposição dos agentes bacterianos a

subdoses, favorecendo a seleção de bactérias resistentes e a eliminação de grandes quantidades de antimicrobianos no meio ambiente a partir dos dejetos destes animais.

Aos problemas relacionados ao tratamento somam-se ainda as dificuldades em encontrar dados na literatura sobre os principais agentes bacterianos envolvidos nestes quadros e seus perfis de resistência a antimicrobianos, com poucos estudos e muitas vezes datando da década de 1980. Além disso, os estudos são normalmente baseados em métodos de cultura tradicionais, cujo resultado pode apresentar grande variabilidade de acordo com os meios utilizados. Além disso, muitos microrganismos não apresentam crescimento em meios mais simples (HUGENHOLTZ; TYSON, 2008) e, portanto, pouco se conhece sobre a microbiota vaginal da fêmea suína e como ele pode ser alterado nas infecções que causam descarga vulvar. Deve-se considerar ainda que algumas bactérias presentes nessas infecções podem apresentar potencial zoonótico e são desconhecidas pelos produtores e médicos veterinários. Tendo em vista esta lacuna na pesquisa de agentes infecciosos de impacto econômico na produção de suínos, e de potencial impacto em saúde pública, a proposta deste estudo foi identificar os patógenos envolvidos em infecções genitais de fêmeas suínas por meio da cultura e do sequenciamento do gene 16S rRNA, possibilitando a caracterização da microbiota do canal vaginal de porcas com e sem descarga vulvar purulenta e a caracterização dos perfis de resistência aos antimicrobianos para os principais agentes bacterianos envolvidos nesse quadro.

2. CAPÍTULO 1: Caracterização de patógenos bacterianos isolados de descarga vulvar purulenta em suínos: cultura, espectrometria de massa MALDI-TOF e perfil de resistência aos antimicrobianos

2.1 Introdução

As descargas vulvares e as infecções urogenitais causam grandes preocupações para os produtores de suínos e veterinários, e o aumento da ocorrência dessas afecções está diretamente associado à intensificação do manejo na produção de suínos (FARNUM; RIESE, 1989). As manifestações clínicas mais comuns incluem a presença de secreção purulenta na região vulvar, falha reprodutiva, queda na performance, inapetência e má condição corporal das fêmeas suínas, podendo com frequência levar ao descarte do animal (DIAL; MACLACHION, 1988; KIRKWOOD et al., 2012).

Logo, essas doenças são fontes de grandes prejuízos econômicos ao produtor, uma vez que a eficiência reprodutiva do rebanho é comprometida, tendo como consequência o aumento do intervalo entre partos, menor fertilidade nos ciclos subsequentes, redução do número de leitões paridos por porca durante o ano e redução no peso da leitegada, principalmente em porcas com maior ordem de parição, além dos custos com o tratamento dos animais (MUIRHEAD, 1978; WALLER; BILKEI; CAMERON, 2002; GLOCK; BILKEI, 2005). Portanto, o status sanitário do aparelho reprodutivo das fêmeas suínas interfere diretamente nos resultados de prolificidade destas, o que influencia o desempenho reprodutivo do plantel (DA SILVEIRA; SCHEID; ZANELLA, 2007).

2.2 Revisão de literatura

A maioria das infecções urogenitais ascende a partir da vagina e um dos sinais clínicos mais evidente das infecções urogenitais são as descargas vulvares, que podem ser provenientes da vulva, vagina, cérvix, útero ou das vias urinárias, como bexiga e rins (DA SILVEIRA; SCHEID; ZANELLA, 2007). Os fatores predisponentes estão majoritariamente relacionados ao ambiente e ao manejo, principalmente, nas criações intensivas: movimentação restrita das fêmeas resulta na redução da ingestão de água e menor frequência de micção; a umidade elevada nas instalações provoca o acúmulo de urina e secreções no solo; a má higiene do ambiente e dos equipamentos, como inadequada remoção das fezes do solo e a limpeza imprópria da vulva das fêmeas antes da cobertura ou da inseminação artificial (FARNUM; RIESE, 1989). Aliados a estes fatos, e Segundo Silveira et al. (2007), existem períodos críticos no ciclo reprodutivo que tornam o trato reprodutivo da fêmea vulnerável às infecções, como a abertura da cérvix relacionada à fisiologia do estro e do parto. O estresse físico da parição e da monta ou inseminação artificial também favorece essas infecções, uma vez que origina alterações imunológicas e favorece o aumento da população bacteriana no trato reprodutivo das fêmeas (DA SILVEIRA; SCHEID; ZANELLA, 2007), além da associação com outras doenças, como a síndrome metrite-mastite-agalaxia dos suínos (WALLER; BILKEI; CAMERON, 2002). Biksi et al., (2002) também encontrou uma forte correlação positiva entre urocistite e endometrite, sendo que os animais com urocistite tinham 3,5 vezes mais chances de também apresentar endometrite.

A característica e o volume da descarga vulvar variam de acordo com a enfermidade. A endometrite é a infecção do endométrio e de camadas glandulares que pode apresentar diferentes manifestações clínicas, como cornos uterinos repletos

de secreção mucopurulenta ou apenas uma hiperemia na superfície mucosa ou até mesmo nenhuma alteração evidente (DEE, 1992). Na metrite, que é a infecção do útero como um todo, envolvendo inclusive a camada muscular, a descarga vulvar é caracterizada por um odor fétido, com presença de tecido necrótico, conteúdo de membranas fetais em autólise e fluido proteico; a porca pode apresentar anorexia, hipertermia e pode vir a óbito devido à septicemia (DEE, 1992). Já na cistite, a urina das porcas afetadas pode conter quantidades variáveis de pus e sangue, e a descarga não está relacionada ao estro. A fêmea pode apresentar poliúria e polidipsia, anorexia, hipertermia e pode morrer devido à insuficiência renal aguda (DEE, 1992). A vaginite tem sinais clínicos similares à endometrite, porém a quantidade de descarga geralmente é menor em volume e não tem relação com o ciclo estral (DEE, 1992; ORAVAINEN et al., 2008).

No entanto, a contaminação bacteriana no trato reprodutivo também pode assumir um caráter subclínico, isto é, sem a manifestação de sinais clínicos, mas ainda assim causar prejuízos, como o menor número de leitões nascidos vivos (MARCUS et al., 2012).

Algumas secreções na região vulvar, entretanto, podem ser indicativas de processos fisiológicos, sendo consideradas normais. Logo, um dos desafios reside na identificação de secreções normais e anormais e de onde elas provêm. Descargas vulvares entre 2-3 semanas de gestação e logo após o parto podem ser consideradas normais. As descargas no periestro também podem ser normais, pois os altos níveis de estrógeno resultam no aumento da perfusão uterina, aumento na permeabilidade do tecido e na migração leucocitária no útero. Já as contrações uterinas no proestro e no estro contribuem para a expulsão de conteúdo uterino contendo muco, células epiteliais do trato reprodutivo, leucócitos e até mesmo sêmen (KIRKWOOD et al.,

2012). A presença de sangue também pode ser comum, devido a lacerações da vulva durante a cobertura ou na expulsão dos fetos durante o parto.

Casos individuais de descarga vulvar raramente representam um grande problema. Porém, se 3% ou mais do plantel reprodutivo estiver acometido as causas devem ser investigadas (ALTHOUSE et al., 2019). Em casos mais preocupantes, essas descargas podem estar presentes em até 25% do plantel, e mais de dois terços desse percentual podem apresentar problemas reprodutivos, como falha na fertilização ou falsa gestação após cobertura (DA SILVEIRA; SCHEID; ZANELLA, 2007). A ocorrência de descarga vulvar mucopurulenta por mais de seis dias também está associada a problemas de infertilidade no ciclo subsequente da fêmea e pode afetar a saúde e o potencial de crescimento da leitegada (WALLER; BILKEI; CAMERON, 2002).

Segundo Kirkwood et al. (2012) a ocorrência de descarga vulvar durante 10 dias ou mais pode ser sugestiva de metrite ou endometrite, sendo que a maioria dessas infecções são causadas por agentes como *Escherichia coli*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Trueperella pyogenes*, *Proteus sp.*, *Klebsiella sp.* e outros. Em grande parte dos casos, as bactérias isoladas da vesícula urinária ou do endométrio são representadas por agentes comuns a microbiota fecal (BIKSI et al., 2002). Entretanto, alguns autores citam outros agentes como potenciais causadores de infecções urogenitais em suínos, como *Leptospira spp.*, e *Chlamydia spp.* (BUSCH et al., 2000; NATHUES et al., 2011), *Streptococcus dysgalactiae* (MORENO et al., 2016) e *Corynebacterium diphtheriae* (POOR et al., 2017). Em estudo realizado por Winter et al., (1995) foram avaliados úteros de 73 fêmeas, neste estudo houve isolamento bacteriano em 56% das fêmeas que apresentavam descarga vulvar, e em apenas 20% das fêmeas sem este sinal clínico ($p < 0,05$). Os agentes mais isolados em ambos os grupos foram *E. coli* (50%), *Staphylococcus spp.* (28%) e *Streptococcus spp.* (11%).

Segundo este mesmo autor, foi possível reproduzir a descarga vulvar a partir de uma infecção intrauterina experimental com *Escherichia coli* e com *Staphylococcus hyicus* (DE WINTER et al., 1995). Wanyoike e Bilkei (2006) avaliaram 1070 fêmeas suínas que apresentavam descarga vulvar excessiva, hipogalaxia e infecções urogenitais. *Escherichia coli* e muitos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos foram encontrados em todas as amostras de descarga vulvar; e porcas de maior ordem de parição apresentaram mais alterações patológicas em oviduto, ovários, útero e órgãos urinários do que fêmeas primíparas (WANYOIKE; BILKEI, 2006).

Os antimicrobianos têm sido amplamente empregados para tratar as infecções urogenitais. O fornecimento de ração medicada ou a aplicação de antimicrobianos injetáveis são as formas mais comuns de tratamento (ALTHOUSE et al., 2019). É comum que se adote um protocolo de tratamento profilático para todos os animais em risco, quando o quadro de descarga vulvar atinge uma parcela considerável do plantel reprodutivo (ALTHOUSE et al., 2019). Segundo Dee (1992), os principais antimicrobianos recomendados na literatura e utilizados na prática para o tratamento destas infecções são as penicilinas e as tetraciclinas. Wentz et al., (1986), ao avaliar 112 animais com secreção vulvar mucopurulenta, relatam que as estirpes de *Escherichia coli* isoladas apresentaram maior sensibilidade à associação sulfametoxazole e trimetoprima, à polimixina e à gentamicina. Para as amostras de *Staphylococcus spp.* isoladas destes animais, a gentamicina apresentou melhor resultado (WENTZ et al., 1986). Em estudo realizado na Dinamarca, avaliando o uso de antimicrobianos em vários rebanhos desse país, as tetraciclinas foram as mais utilizadas em sistemas de produção de suínos, e 36% dos isolados de *E. coli* deste estudo foram resistentes à essa classe (PETERSEN; SKOV; LARSEN, 2013).

Segundo Althouse et al. (2019), para obter o melhor efeito no tratamento com antimicrobianos, deve-se identificar os agentes envolvidos nas descargas vulvares e

determinar a sensibilidade destes aos antimicrobianos em questão para auxiliar na seleção do produto e do regime de tratamento. Porém, na prática do campo, esses fatores raramente são verificados, o que dificulta bastante a avaliação da eficácia desses tratamentos (DIAL & MACLACHLAN, 1988). Outro aspecto é que, apesar do tratamento profilático via ração medicada ser vantajoso - principalmente por tratar muitos animais ao mesmo tempo sem demandar excessiva mão de obra - ele pode apresentar problemas como a sub-dosagem do antimicrobiano e o favorecimento da seleção de bactérias resistentes.

De uma maneira geral, a identificação dos agentes envolvidos, apesar de crucial para a escolha do tratamento, muitas vezes não acontece com uma frequência adequada dentro da rotina das granjas comerciais. A ausência do diagnóstico preciso, geralmente é justificada pela distância das propriedades dos centros de pesquisa ou laboratórios especializados, pela dificuldade na coleta e no envio de material adequado para o diagnóstico e/ou pelo tempo necessário para resultados laboratoriais ficarem disponíveis. Dessa forma, a utilização de métodos mais ágeis de identificação pode auxiliar nesse cenário. Entre eles, a espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz: tempo de voo (MALDI-TOF) tem se mostrado uma boa alternativa para identificação de colônias bacterianas isoladas de suínos (PROHASKA et al., 2014; MORENO et al., 2017, 2018; PÉREZ-SANCHO et al., 2017).

Assim, na primeira parte deste trabalho, foi realizada a cultura das amostras coletadas do canal vaginal de fêmeas suínas com e sem descarga vulvar purulenta, visando o isolamento, identificação e determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos para os principais agentes isolados nesse quadro clínico.

2.3 Objetivos

Isolar e identificar os agentes microbianos envolvidos em descargas vulvares de fêmeas suínas por meio da cultura e identificação pela espectrometria de massa MALDI-TOF e caracterizar, para os principais agentes bacterianos, o perfil de resistência aos antimicrobianos.

2.4 Material e métodos

2.4.1 Material

Foram coletadas 310 amostras, sendo 270 amostras de fêmeas com descarga vulvar (DV), e 40 fêmeas saudáveis (SD), provenientes de quatro sistemas intensivos de produção de suínos (Tabela 1).

Tabela 1: Descrição das granjas avaliadas.

Granja	Estado	Rebanho (matriz)	Número de amostras avaliadas	
			Com sinais de metrite	Sem sinais de metrite
G1	Minas Gerais	5200	53	10
G2	Paraná	10000	55	10
G3	São Paulo	3500	40	10
G4	Mato Grosso	17000	122	10
Total		35000	270	40

As amostras foram coletadas com suabe de haste plástica de forma asséptica na região profunda do canal vaginal por meio do uso de espéculos vaginais descartáveis (Figura 1 e 2). Os suabes foram acondicionados em meio de cultura de Stuart e mantidos sob refrigeração (4°C) até a chegada ao laboratório de Sanidade Suína da FMVZ/USP para o processamento.



Figura 1: A – Fêmea suína com descarga vulvar. B - Coleta de amostra da região profunda do canal vaginal de forma asséptica com suabe de haste plástica. Fonte: Poor, 2018.

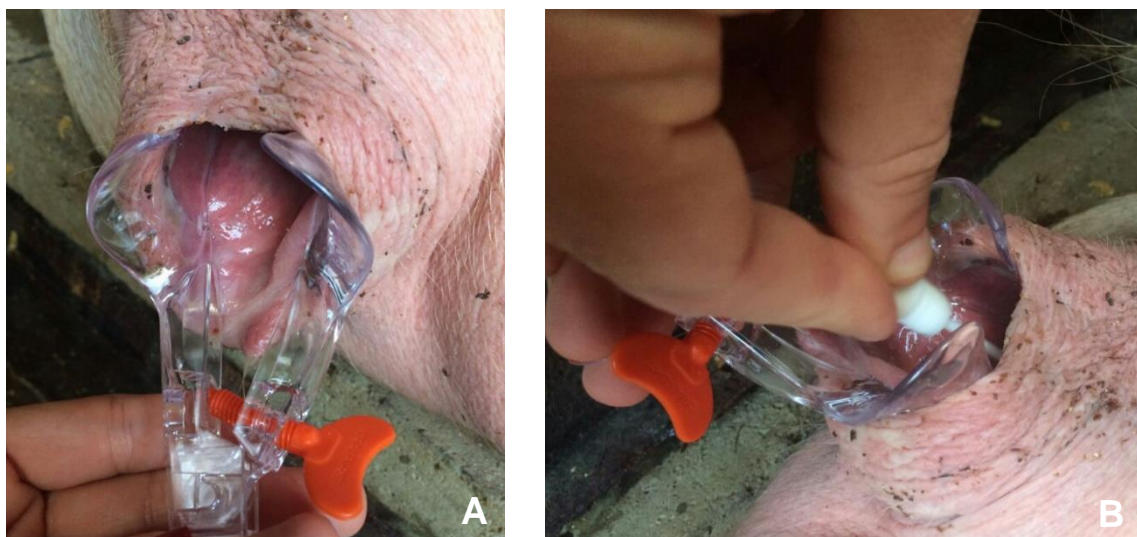


Figura 2: A - Introdução do espéculo vaginal descartável na vulva da fêmea suína. B - Coleta de amostra da região profunda do canal vaginal de forma asséptica com suabe de haste plástica. Fonte: Dutra, M.C. 2016.

2.4.2 Isolamento bacteriano

Os suabes foram semeados em ágar MacConkey, Chromagar Orientation® e ágar Columbia com 5% sangue de carneiro (Difco-BBL, Detroit, MI /USA) e as placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas em aerobiose. Para o crescimento em anaerobiose, as amostras foram semeadas em ágar Brucella com 5% de sangue de carneiro, hemina e menadiona (Difco-BBL, Detroit, MI /USA) incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. As colônias bacterianas isoladas foram semeadas em 3,0 ml de caldo BHI (*Brain Heart Infusion* –Difco) e a partir deste cultivo foram separadas alíquotas para estoque a -80° C com 30% de glicerol, para extração de DNA e para identificação pela espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight*) (Figura 3).

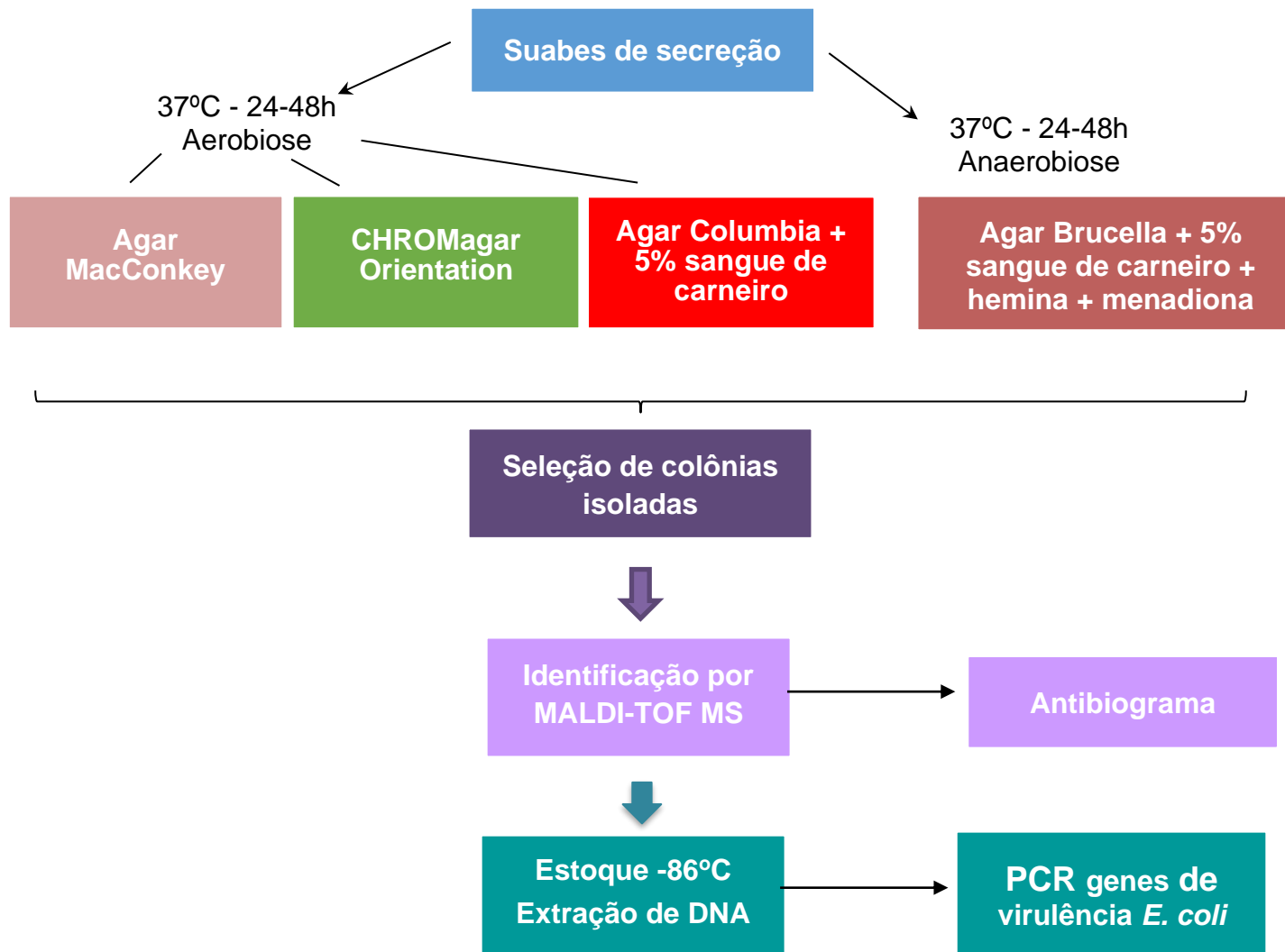


Figura 3: Organograma descrevendo as etapas do estudo.

2.4.3 Identificação das estirpes por MALDI-TOF MS

As colônias bacterianas foram submetidas a extração de proteína ribossomal utilizando o protocolo descrito por Hijazin et al. (2012). Foi utilizado o espectrofotômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik) da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, com o auxílio técnico da Dra. Maria Inês Zanoli Sato e sua equipe. Para a captura dos espectros proteicos, 1,0 µl de suspensão proteica foi transferido para a placa de aço inox de 96 poços e, após secar em temperatura ambiente, foi adicionado 1,0 µl de matriz polimérica (*α-cyano-4-hydroxycinnamic acid*). Cada estirpe foi distribuída em três poços e para cada placa foram realizadas duas leituras. Para captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa FlexControl™ (Bruker Daltonik) pelo método MTB_autoX. O espectrofotômetro foi externamente calibrado através da utilização de proteínas ribossômicas de *Escherichia coli* (BTS - Bruker Daltonik).

Para a identificação microbiana foi utilizado o programa BioTyper™ 3.0 (Bruker Daltonik), a partir do qual foi realizada uma comparação dos espectros capturados de para cada estirpe com a biblioteca do fabricante. Pela comparação de presença/ausência de picos específicos obteve-se um valor de escore (*log (score) value*). Os critérios para a interpretação dos padrões utilizados neste estudo foram os da fabricante Bruker Daltonik, como seguem: escores ≥ 2.0 foram aceitos para atribuição de espécie; e escores ≥ 1.7 e < 2.0 foram utilizados apenas para identificação de gênero.

2.4.4 Caracterização dos perfis de resistência aos antimicrobianos para os principais agentes

A caracterização do perfil de resistência a antimicrobianos foi realizada pelo teste de microdiluição em caldo, conforme os padrões definidos no documento VET01 (CLSI, 2020). Para a preparação do inóculo, as estirpes foram cultivadas em caldo BHI (Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas. A turbidez do cultivo foi ajustada com solução salina estéril (0,9%) de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland e confirmada em espectrofotômetro (0,150 a 600 nm). Esta suspensão bacteriana ajustada possui aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/ml, que foi novamente diluída na ordem de 1:1000 em caldo Mueller Hinton II (Difco) de maneira a obter uma concentração final de, aproximadamente, 5×10^5 UFC/ml. Posteriormente, 50 µl desta suspensão foram distribuídos em cada poço da microplaca, que foi selada e incubada a 37°C por 24 horas.

Para as estirpes de *Escherichia coli*, os princípios testados foram: ceftiofur, amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, cefalexina, oxitetraciclina, florfenicol, marbofloxacina, enrofloxacina, ciprofloxacina, gentamicina, neomicina, espectinomicina, estreptomicina, sulfametoxazol, sulfametoxazol + trimetoprima, azitromicina, colistina e fosfomicina.

Para as estirpes de agentes Gram-positivos, os antimicrobianos testados foram: ceftiofur, amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, cefalexina, oxitetraciclina, florfenicol, enrofloxacina, marbofloxacina, gentamicina, espectinomicina, estreptomicina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina + trimetoprima, clindamicina, tildipirosina, tiamulina e tulatromicina.

As concentrações inibitórias mínimas foram aferidas visualmente como as menores contrações dos antimicrobianos nos poços sem crescimento bacteriano (sem a

formação de botão). Foram utilizadas como controle de qualidade as estirpes *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922. As CIM₅₀ e CIM₉₀ foram determinadas conforme descrito por SCHWARZ et al.,(2010).

2.4.5 Análise estatística

O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar as frequências dos principais agentes isolados no método de cultura e identificados por MALDI-TOF MS, entre rebanhos e entre porcas SD e DV, sob nível de significância de 5%, utilizando-se o software R-Studio (R Core Team, 2020). Gráficos do tipo *upset plot*, para a associação de diferentes espécies bacterianas foram feitos com o pacote *Complex Heatmap* (GU; EILS; SCHLESNER, 2016) e diagramas de Venn foram realizados com o pacote *ggVennDiagram* (GAO; YU; CAI, 2021) no software R-Studio (R Core Team, 2020).

2.5 Resultados

2.5.1 Isolamento e identificação bacteriana

Das 270 fêmeas com descarga vulvar purulenta, 98,5% (266/270) foram positivas para isolamento bacteriano. Destas, apenas 11% das amostras apresentaram o crescimento de apenas uma espécie bacteriana; 88% das amostras geraram culturas mistas, com até oito diferentes espécies isoladas da mesma amostra (Tabela 2). Das amostras de fêmeas saudáveis, 97,5% (39/40) apresentaram crescimento bacteriano. Sete amostras (18% - 7/39) apresentaram crescimento apenas para um agente e 82% (32/39) das amostras geraram culturas mistas (Tabela 3).

Mais de 70% das fêmeas que apresentaram descarga vulvar estavam na fase de lactação, enquanto 20% das fêmeas coletadas estavam em fase de gestação. O restante (9%) foram fêmeas coletadas no intervalo desmame-estro, marrãs que ainda não entraram no plantel reprodutivo e de fêmeas já separadas para o descarte (Figura 4).

Tabela 2: Características do crescimento bacteriano nas amostras de fêmeas com descarga vulvar em cada granja – N (%).

Granja	Crescimento bacteriano	
	Misto	Simples
G1	45 (85)	8 (15)
G2	49 (89)	6 (11)
G3	35 (87,5)	5 (12,5)
G4	108 (91,5)	10 (8,5)
Total	237/266 (89)	29/266 (11)

Tabela 3: Características do crescimento bacteriano nas amostras de fêmeas saudáveis em cada granja – N (%).

Granja	Crescimento bacteriano	
	Misto	Simples
G1	7 (70)	3 (30)
G2	8 (80)	2 (20)
G3	9 (100)	0 (0)
G4	8 (80)	2 (20)
Total	32/39 (82)	7/39 (18)

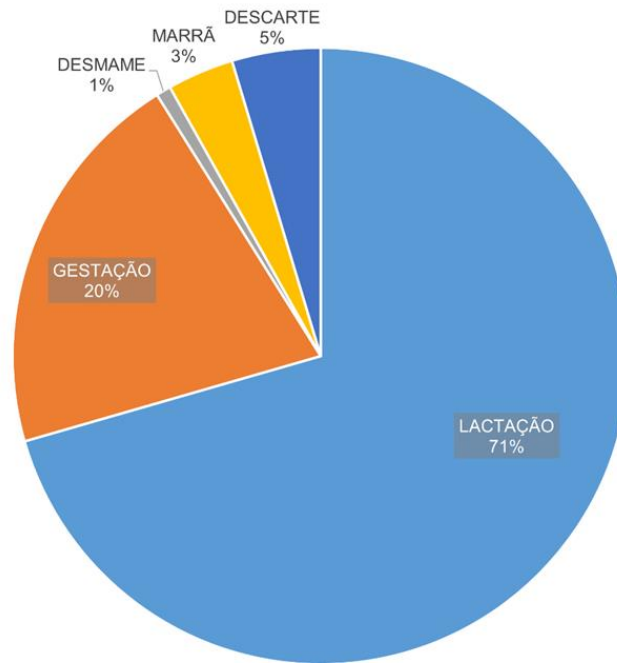


Figura 4: Fase do ciclo na qual as fêmeas com descarga vulvar foram amostradas.

A espectrometria de massa MALDI-TOF foi capaz de identificar um total de 115 espécies bacterianas, e as mais frequentemente isoladas e identificadas são apresentadas nas Tabelas 4 e 5. Na figura 5, as proporções são representadas graficamente e com a indicação do resultado do teste exato de Fisher. As associações entre bactérias mais frequentes são apresentadas nas Figuras 6 e 7.

Tabela 4: Espécies bacterianas identificadas com maior frequência nas fêmeas com descarga vulvar purulenta (n = 266).

Agente	Nº de fêmeas positivas (%)
<i>Escherichia coli</i>	145 (54,5)
<i>Streptococcus suis</i>	61 (22,9)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	70 (26,3)
<i>Staphylococcus hyicus</i>	46 (17,3)
<i>Enterococcus faecalis</i>	45 (16,9)
<i>Proteus mirabilis</i>	29 (10,9)
<i>Actinomyces hyovaginalis</i>	25 (9,4)
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	21 (7,9)
<i>Trueperella abortusis</i>	21 (7,9)
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	20 (7,5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	17 (6,4)
<i>Trueperella pyogenes</i>	14 (5,3)
<i>Bacillus cereus</i>	13 (4,9)
<i>Enterococcus faecium</i>	13 (4,9)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	13 (4,9)
<i>Prevotella heparinolytica</i>	11 (4,1)
<i>Streptococcus porcinus</i>	11 (4,1)
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	10 (3,8)
<i>Bacteroides pyogenes</i>	9 (3,4)
<i>Streptococcus canis</i>	7 (2,6)

Tabela 5: Espécies bacterianas identificadas com maior frequência nas fêmeas saudáveis (n = 39).

Agente	Nº de fêmeas positivas (%)
<i>Escherichia coli</i>	27 (69,2)
<i>Enterococcus faecalis</i>	13 (33,3)
<i>Trueperella abortusis</i>	5 (12,8)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	5 (12,8)
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	4 (10,3)
<i>Streptococcus suis</i>	4 (10,3)
<i>Aerococcus viridans</i>	3 (7,7)
<i>Rothia nasimurium</i>	3 (7,7)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (7,7)
<i>Staphylococcus hyicus</i>	3 (7,7)
<i>Staphylococcus simulans</i>	3 (7,7)
<i>Streptococcus hyovaginalis</i>	3 (7,7)
<i>Streptococcus orisratti</i>	3 (7,7)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2 (5,1)
<i>Actinomyces hyovaginalis</i>	2 (5,1)
<i>Anaerococcus prevotii</i>	2 (5,1)
<i>Corynebacterium sp.</i>	2 (5,1)
<i>Proteus mirabilis</i>	2 (5,1)
<i>Rothia aerolata</i>	2 (5,1)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2 (5,1)

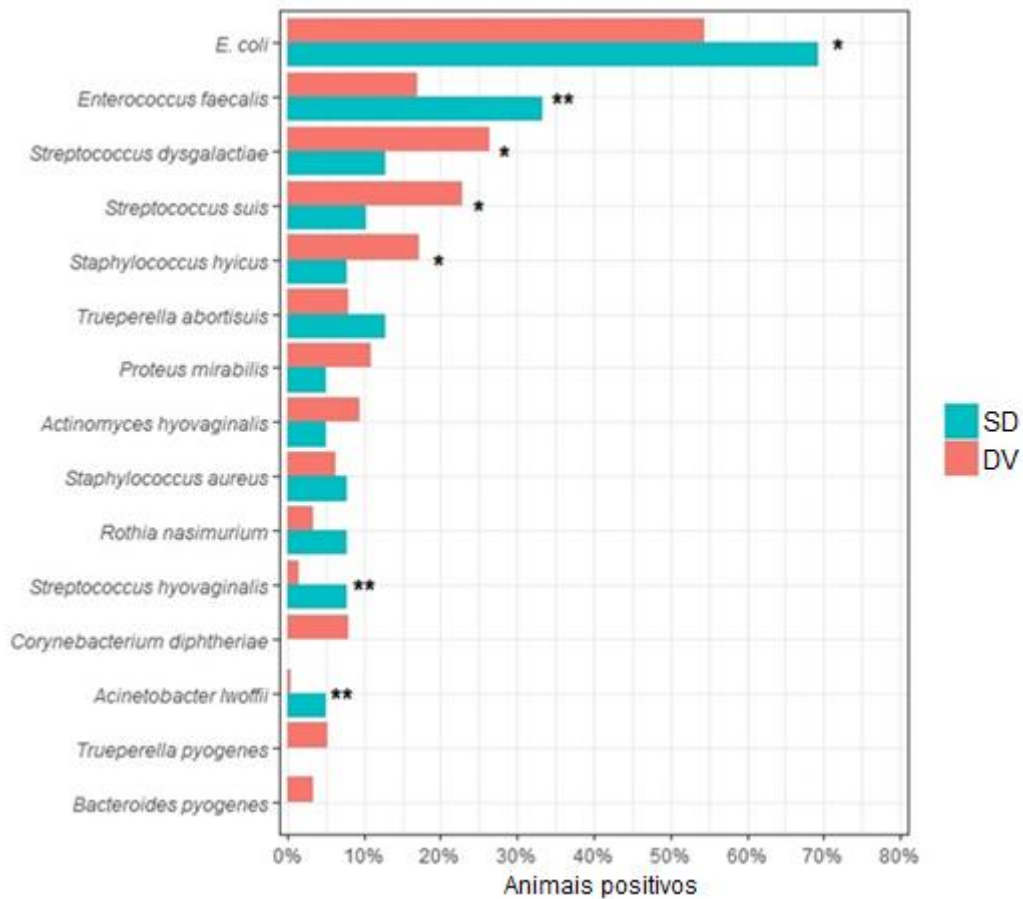


Figura 5: Frequência para as principais espécies isoladas em fêmeas saudáveis (SD) e com descarga vulvar (DV) pela técnica de cultura e identificação por MALDI-TOF MS. Vermelho: porcas com descarga vulvar purulenta; Azul: porcas saudáveis.

* Teste exato de Fisher, $0,05 \leq p < 0,1$.

** Teste exato de Fisher, $p < 0,05$.

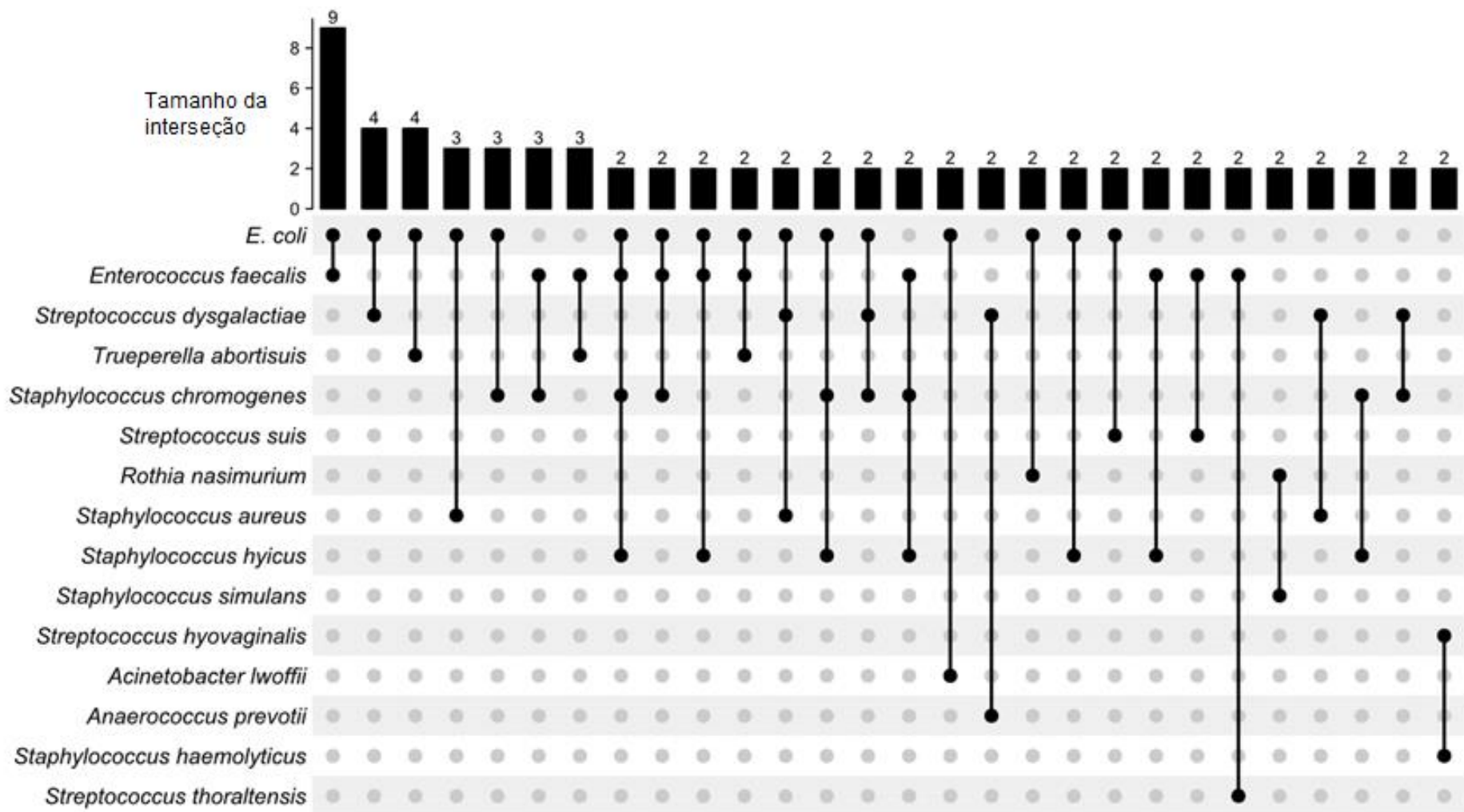


Figura 7: UpSet plot para animais saudáveis (n =39). Os números sobre as barras mostram a quantidade de animais nos quais os agentes, indicados pelos pontos preenchidos, foram isolados em conjunto.

Tanto em fêmeas saudáveis como em fêmeas com descarga vulvar purulenta (DV) houve predominância de alguns gêneros bacterianos, como *Escherichia*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. As fêmeas do grupo saudável (SD) tiveram maior frequência de algumas espécies quando comparadas com fêmeas do grupo DV, como *Enterococcus faecalis* (33.3% vs. 16.9%, $p = 0.02$), *Streptococcus hyovaginalis* (7,7% vs. 1,5%, $p = 0,04$) e *Acinetobacter lwoffii* (5,1% vs. 0,4%, $p = 0,04$). Embora as porcas do grupo SD tenham apresentado uma maior frequência de isolamento de *Escherichia coli*, não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,06$). Porcas do grupo DV também mostraram maior frequência para algumas espécies, mas também sem diferença significativa, como *Streptococcus dysgalactiae* (26,3% vs. 12,8%, $p = 0,09$) e *Staphylococcus hyicus* (17,3% vs. 7,7%, $p = 0,09$). *Trueperella pyogenes* (5,3% vs. 0%). Agentes como *Bacteroides pyogenes* (3.4% vs. 0%) e *Corynebacterium diphtheriae* (7.9% vs. 0%) foram isolados somente de porcas do grupo DV.

Os gráficos de *UpSet plot* das figuras 6 e 7 mostram que fêmeas do grupo DV apresentaram maior número de associações e maior frequência para algumas delas do que em fêmeas do grupo SD, com as mais frequentes sendo entre *Escherichia coli* e *Streptococcus dysgalactiae*, com 42 animais (15,8%), seguido por *Escherichia coli* e *Streptococcus suis* (12.8%), *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* (9.4%) e *Escherichia coli* e *Staphylococcus hyicus* (7.1%). Enquanto para o grupo de fêmeas SD as associações mais frequentes foram entre *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* (23%), *Escherichia coli* e *Streptococcus dysgalactiae* (10.2%), *Escherichia coli* e *Trueperella abortusuis* (10.2%) e entre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (7,7%). Ainda, as fêmeas do grupo DV apresentaram associações que não ocorreram no grupo SD, como entre *Escherichia coli* e *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli* e *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli* e *Bacteroides pyogenes*, *Streptococcus*

dysgalactiae e *Trueperella pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Staphylococcus hyicus* e entre *Corynebacterium diphtheriae* e *Streptococcus dysgalactiae*.

Das 115 espécies isoladas e identificadas pela espectrometria de massa MALDI-TOF, 60,87% foram isoladas em fêmeas do grupo DV; 28,7% foram isoladas em ambos os grupos; e 10,43% foram isoladas apenas nas fêmeas do grupo SD (Figura 8). O Quadro 1 mostra os isolados únicos das fêmeas do grupo SD e os principais das fêmeas do grupo DV.

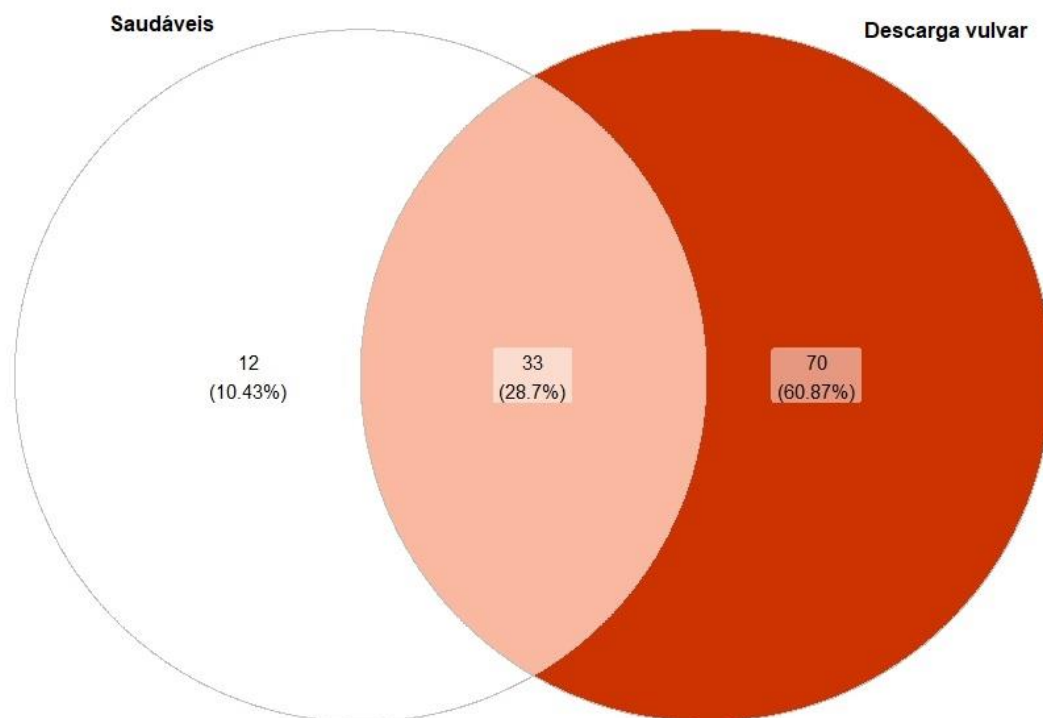


Figura 8: Diagrama de Venn para o conjunto espécies identificadas pela espectrometria de massa MALDI-TOF entre fêmeas com descarga vulvar e fêmeas saudáveis.

Quadro 1: Agentes isolados exclusivamente nos grupos de fêmeas saudáveis (SD) e no grupo de fêmeas com descarga vulvar purulenta (DV).

Agentes únicos em fêmeas SD	Agentes únicos em fêmeas DV
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>
<i>Citrobacter farmari</i>	<i>Bacteroides pyogenes</i>
<i>Comamonas aquatica</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Enterobacter bugandensis</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Enterococcus italicus</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
<i>Enterococcus devriesei</i>	<i>Corynebacterium frankenforstense</i>
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>Pasteurella aerogenes</i>	<i>Corynebacterium xerosis</i>
<i>Rothia aerolata</i>	<i>Helcococcus ovis</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Helcococcus sueciensis</i>
<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>

2.5.2 Perfil de resistência aos antimicrobianos para os principais agentes

O perfil de resistência foi determinado para algumas espécies bacterianas isoladas em maior frequência, sendo selecionado um grupo de agentes Gram-positivos e Gram-negativos. Para essa avaliação foram selecionados entre os Gram-positivos - 46 estirpes de *Staphylococcus hyicus*, 33 estirpes de *Streptococcus dysgalactiae*, 24 estirpes de *Trueperella abortusis*, 19 estirpes de *Trueperella pyogenes* e 19 estirpes de *Corynebacterium diphtheriae*. Representando os Gram-negativos, foram avaliadas as estirpes de *Escherichia coli*, sendo que, devido a sua importância, o perfil de resistência é apresentado em um capítulo a parte em conjunto com a detecção de genes de virulência.

As estirpes de *Staphylococcus hyicus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium diphtheriae* apresentaram sensibilidade aos beta-lactâmicos, às sulfonamidas e à gentamicina. Elevados níveis de resistência foram identificados frente a oxitetraciclina, florfenicol, quinolonas, clindamicina, tiamulina, espectinomicina e estreptomina (Tabelas 6 a 8). Ainda, as estirpes de *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium diphtheriae* apresentaram maiores níveis de resistência para tildipirosina e tulatromicina.

As estirpes de *Trueperella pyogenes* e *Trueperella abortusis* também apresentaram sensibilidade à classe dos beta-lactâmicos e à gentamicina. Porém, as estirpes da espécie *Trueperella abortusis* apresentaram maiores taxas de resistência às quinolonas, aos outros membros da classe de aminoglicosídeos, ao florfenicol, à oxitetraciclina e à clindamicina se comparada com a espécie *Trueperella pyogenes*. Para as sulfonamidas, as estirpes se dividiram entre resistentes e sensíveis, com maior nível de resistência de *Trueperella abortusis* para sulfa + trimetoprima (Tabelas 9 e 10).

Tabela 6: Distribuição dos valores de CIM, valores de CIM 50, CIM 90 e taxa de resistência identificada entre as estirpes de *Staphylococcus hyicus*.

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)																	CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
	≤0,06	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024			
Ceftiofur				12	25	8	1	0	0									0,5	1	0,0
Ampicilina						41	2	0	1	0	2	0						≤1	2	4,3
Cefalexina					2	7	29	7	0	0	0	1						2	4	2,2
Oxitetraciclina							14	0	1	1	5	25						>32	>32	67,4
Florfenicol					0	0	3	0	1	42								>8	>8	91,3
Marbofloxacina		0	2	0	1	1	7	6	29									>4	>4	76,1
Enrofloxacin			1	3	1	1	10	13	17									4	>4	65,2
Gentamicina					35	1	0	1	0	1	8							≤0,5	>16	19,6
Espectinomicina									1	0	1	1	2	41				>128	>128	93,5
Estreptomicina						0	1	1	0	0	44							>16	>16	95,7
Sulfametoxazol														45	1	0		≤256	≤256	2,2
Clindamicina				1	2	1	0	0	42									>4	>4	91,3
Tildipirosina						0	6	11	10	7	12							8	>16	41,3
Tiamulina							2	0	1	7	3	33						>32	>32	78,3
Tulatromicina						12	16	4	3	0	0	1	10					2	>64	23,9

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)										CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
	≤1/0,5	1/0,5	2/1	4/2	8/4	16/8	32/16	64/32	>64/32				
Amox/Ác. clavulânico	42	0	0	0	2	0	1	1	0		≤10,5	≤10,5	4,3
	≤1/19	1/19	2/38	4/76	>4/76	-	-	-	-				
Trimetoprima/ sulfametoxazol	44	0	2	0	0						≤1/19	≤1/19	0,0

Tabela 7: Distribuição dos valores de CIM, valores de CIM 50, CIM 90 e taxa de resistência identificada entre as estirpes de *Streptococcus dysgalactiae*.

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)																	CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
	≤0,06	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024			
Ceftiofur				30	0	2	0	0	0	1								≤0,25	≤0,25	3,0
Ampicilina						28	1	0	0	0	0	0	4					≤1	>64	12,1
Cefalexina					17	11	1	0	2	0	0	2						≤0,5	8	12,1
Oxitetraciclina							2	0	0	1	2	28						>32	>32	93,9
Florfenicol					1	7	5	2	4	14								8	>8	42,4
Marbofloxacina		1	1	0	0	3	9	7	12									4	>4	57,6
Enrofloxacina			1	1	3	2	9	9	8									4	>4	51,5
Gentamicina					7	4	9	4	1	2	6							2	>16	24,2
Espectinomomicina									1	0	0	0	6	26				>128	>128	97,0
Estreptomicina						1	0	0	0	0	32							>16	>16	97,0
Sulfametoxazol														29	1	2	1	≤256	512	12,1
Clindamicina				5	2	2	2	4	18									>4	>4	66,7
Tildipirosina						1	0	3	3	3	23							>16	>16	78,8
Tiamulina							4	1	1	2	0	25						>32	>32	75,8
Tulatromicina						5	2	2	0	0	1	1	22					>64	>64	69,7

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)										CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
	≤1/0,5	1/0,5	2/1	4/2	8/4	16/8	32/16	64/32	>64/32				
Amox/Ác. clavulânico	28	0	1	0	0	0	2	1	1		≤1/0,5	32/16	12,1
	≤1/19	1/19	2/38	4/76	>4/76	-	-	-	-				
Trimetoprima/ sulfametoxazol	31	0	0	0	2						≤1\9	≤1\9	6,1

Tabela 8: Distribuição dos valores de CIM, valores de CIM 50, CIM 90 e taxa de resistência identificada entre as estirpes de *Corynebacterium diphtheriae*.

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)																CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %	
	≤0,06	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024				>1024
Ceftiofur				14	3	2	0	0	0									≤0,25	1	0,0
Ampicilina						19	0	0	0	0	0							≤1	≤1	0,0
Cefalexina					6	9	4	0	0	0								1	2	0,0
Oxitetraciclina							4	0	0	4	3	8						32	>32	78,9
Florfenicol					0	2	0	1	1	15								>8	>8	78,9
Marbofloxacina		0	0	4	0	1	4	5	5									4	>4	52,6
Enrofloxacina			5	0	3	5	3	1	2									1	>4	15,8
Gentamicina					16	2	0	1	0	0								≤0,5	1	0,0
Espectinomicina									3	0	0	0	1	15				>128	>128	84,2
Estreptomina						2	0	1	0	1	15							>16	>16	84,2
Sulfametoxazol														17	2	0		≤256	512	10,5
Clindamicina				3	0	0	1	1	14									>4	>4	78,9
Tildipirosina						1	2	0	0	0	16							>16	>16	84,2
Tiamulina							14	2	2	0	0	1						≤2	8	5,3
Tulatromicina						3	1	1	1	0	3	4	6					64	>64	52,6

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)										CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
	≤1/0,5	1/0,5	2/1	4/2	8/4	16/8	32/16	64/32	>64/32				
Amox/Ác. clavulânico	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	≤10,5	≤10,5	0,0
	≤1/19	1/19	2/38	4/76	>4/76	-	-	-	-	-			
Trimetoprima/ sulfametoxazol	17	0	1	0	1						≤19	2/38	5,3

Tabela 9: Distribuição dos valores de CIM, valores de CIM 50, CIM 90 e taxa de resistência identificada entre as estirpes de *Trueperella pyogenes*.

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)																CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %	
	≤0,06	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024				>1024
Ceftiofur				19	0	0	0	0	0									≤0,25	≤0,25	0,0
Ampicilina						18	1	0	0	0	0							≤1	≤1	0,0
Cefalexina					2	4	6	7	0	0	0							2	4	0,0
Oxitetraciclina							10	2	6	1	0							≤2	8	5,3
Florfenicol					0	6	12	1	0									2	2	0,0
Marbofloxacina		0	0	0	0	8	11	0										2	2	0,0
Enrofloxacina			0	0	0	17	2	0										1	2	0,0
Gentamicina					11	6	2	0	0	0								≤0,5	2	0,0
Espectinomicina									5	0	0	0	0		14			>128	>128	73,7
Estreptomina						15	2	2	0	0								≤1	4	0,0
Sulfametoxazol														12	7	0		≤256	512	36,8
Clindamicina				18	0	1	0	0										≤0,25	≤0,25	0,0
Tildipirosina						5	0	0	0	0	14							>16	>16	73,7
Tiamulina							19	0	0	0	0							≤2	≤2	0,0
Tulatromicina						5	0	0	1	0	0	5	8					64	>64	68,4

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)										CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
	≤1/0,5	1/0,5	2/1	4/2	8/4	16/8	32/16	64/32	>64/32				
Amox/Ác. clavulânico	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	≤1/0,5	≤1/0,5	0,0
	≤1/19	1/19	2/38	4/76	>4/76	-	-	-	-	-			
Trimetoprima/ sulfametoxazol	8	0	0	6	5						4/76	>4/76	57,9

Tabela 10: Distribuição dos valores de CIM, valores de CIM 50, CIM 90 e taxa de resistência identificada entre as estirpes de *Trueperella abortusuis*.

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)																CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %	
	≤0,06	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024				>1024
Ceftiofur				19	5	0	0	0	0									≤0,25	0,5	0,0
Ampicilina						24	0	0	0	0	0	0						≤1	≤1	0,0
Cefalexina					0	0	0	2	3	8	7	4						16	>32	91,7
Oxitetraciclina							0	1	3	10	5	5						16	>32	83,3
Florfenicol					0	0	0	2	5	17								>8	>8	70,8
Marbofloxacina		0	0	0	2	2	7	1	12									4	>4	54,2
Enrofloxacina			0	0	2	6	2	3	11									4	>4	58,3
Gentamicina					8	10	2	1	1	0	2							1	8	8,3
Espectinomicina									2	0	0	0	22					>128	>128	91,7
Estreptomicina						9	0	0	0	1	14							>16	>16	62,5
Sulfametoxazol														13	10	1		≤256	512	45,8
Clindamicina				4	0	1	1	0	18									>4	>4	75,0
Tildipirosina						1	0	0	0	0	23							>16	>16	95,8
Tiamulina							13	2	1	4	0	4						≤2	>32	16,7
Tulatromicina						4	0	0	0	1	2	6	11					64	>64	70,8

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)										CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
	≤1/0,5	1/0,5	2/1	4/2	8/4	16/8	32/16	64/32	>64/32				
AmoX/Ác. clavulânico	20	0	4	0	0	0	0	0	0	0	≤1/0,5	2/1	0,0
	≤1/19	1/19	2/38	4/76	>4/76	-	-	-	-				
Trimetoprima/ sulfametoxazol	2	0	4	9	9						4/76	>4/76	75,0

2.6 Discussão

No presente estudo, foi possível o isolamento bacteriano em 98,5% das amostras coletadas com espécuro, das fêmeas apresentando sinais clínicos de infecção uterina. O isolamento de mais de uma espécie bacteriana na grande maioria dos casos, mesmo com os cuidados adotados para a coleta, indica que o canal vaginal da fêmea suína, mesmo em sua região mais profunda, pode ser intensamente colonizado por bactérias, muitas delas com potencial patogênico. Isto fica evidente nos casos em que em um mesmo animal foram isolados até oito agentes diferentes. Esses dados indicam que as infecções do canal reprodutivo de porcas nem sempre se devem somente à ação exclusiva de um patógeno, mas também a um provável desequilíbrio da população bacteriana residente.

Laureckiene et al. (2006) descreve resultados semelhantes de isolamento bacteriano em amostras vaginais de 56 fêmeas suínas, obtendo culturas mistas em 85,4% das amostras. De maneira similar, Bara et al. (1993) ao coletar suabes vaginais de 23 porcas saudáveis, isolou colônias bacterianas de todos os animais, mesmo não havendo sinal de descarga vulvar. Porém, as condições de higiene e os cuidados na coleta nos dois estudos citados não são descritos.

A maior parte (71%) das fêmeas avaliadas com sinal clínico neste estudo estava na fase de lactação. Este achado está de acordo com o estudo de Bara et al. (1993), no qual o número de isolamentos positivos cresceu imediatamente após o parto e diminuiu após o desmame.

De fato, o trato reprodutivo da fêmea suína e de outras espécies animais parece ser mais eficiente em debelar uma infecção quando está sob o domínio de estrógeno quando comparado à progesterona (MEREDITH, 1986; WINTER et al., 1994), pois o estrógeno aumenta a migração de leucócitos para o útero, aumentando também o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular (ROTH; KAEBERLE; HSU, 1982). Isso pode explicar, em parte, o porquê do maior número de fêmeas com sinal clínico de

descarga vulvar e maior número de isolados bacterianos no período pós-parto, antes do retorno ao período cíclico. Além disso, o parto é um momento de grande estresse para a fêmea, associado ao manejo de intensa intervenção obstétrica (palpação vaginal) observado nas granjas atualmente, o que aumenta a probabilidade de introdução bactérias no trato geniturinário e o risco de infecção (MELLAGI et al., 2009).

A abordagem cultura-dependente revelou uma rica população de espécies bacterianas no canal vaginal de porcas, mostrando que as fêmeas DV e HE tiveram predominância de certos táxons como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e espécies de *Streptococcus* e *Staphylococcus*, de acordo com estudos anteriores de isolamento bacteriano do trato reprodutivo de porcas (SCOFIELD; CLEGG; LAMMING, 1974; BARA et al., 1993; MAES; VERDONCK; KRUIF, 1999). No entanto, foram encontradas bactérias com potencial patogênico em frequências mais elevadas nas porcas do grupo DV. Winter et al. reproduziram a síndrome da descarga vulvar através da inoculação experimental uterina com *Staphylococcus hyicus* em fêmeas suínas (DE WINTER et al., 1995). Esta espécie foi isolada com alta frequência em nosso estudo em porcas do grupo DV. *Corynebacterium diphtheriae*, agente já descrito em infecção geniturinária de porcas e de importância em saúde pública por seu papel em infecções humanas (ZASADA; BACZEWSKA-REJ; WARDAK, 2010; POOR et al., 2017; SCHEIFER et al., 2019), assim como *Trueperella pyogenes*, *Bacteroides pyogenes* e *Streptococcus dysgalactiae*, também relatados em distúrbios reprodutivos de vacas e porcas, (JAROSZ; GRĄDZKI; KALINOWSKI, 2014; CUNHA et al., 2018; KIEFER et al., 2021) também foram isolados com maior frequência em porcas do grupo DV.

Ainda, setenta espécies bacterianas foram isoladas apenas nas fêmeas com descarga vulvar, enquanto 12 espécies foram exclusivas das fêmeas saudáveis e 33 foram espécies compartilhadas entre esses grupos. Isso pode indicar que fêmeas com descarga vulvar apresentaram maior diversidade na população bacteriana cultivável do canal vaginal. Porém, isso deve ser visto com cautela e corroborado pela análise

metagenômica completa, uma vez que a identificação pela espectrometria empregada depende da cultura e isolamento dos microrganismos. De fato, *Bacteroides pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Trueperella pyogenes* foram isolados apenas de descargas vulvares purulentas. Esses agentes, já relacionados anteriormente com infecções do canal vaginal de porcas, também se encontraram associados em elevada frequência em porcas com DV, sugerindo que essas associações podem ser importantes para causar doença.

De forma geral, os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos tiveram boa ação contra as estirpes testadas. Porém, houve elevados níveis de resistência para oxitetraciclina, florfenicol, quinolonas, clindamicina, tiamulina e a alguns membros da classe dos aminoglicosídeos, espectinomicina e estreptomicina. Em um amplo estudo realizado por Dutra et al. (2021), que avaliou 25 granjas de suínos no Brasil em um período de 4 anos quanto ao uso de antimicrobianos, observou-se que 88% delas utilizavam tiamulina, 72% utilizavam tetraciclina e 68% utilizavam florfenicol, todos de forma preventiva ou como promotores de crescimento. Ainda, observou-se que esses animais passam 73,7% do seu ciclo de vida expostos aos antimicrobianos (DUTRA et al., 2021). Logo, o intenso uso desses antimicrobianos na suinocultura nacional pode explicar a elevada taxa de resistência encontrada neste estudo.

Wegener et al. obteve resultados semelhantes de estirpes de *S. hyicus* isoladas de suínos com epidermite exsudativa, com boa ação dos antimicrobianos beta-lactâmicos como ampicilina e ceftiofur, mas elevada resistência para espectinomicina, estreptomicina e tetraciclina (WEGENER et al., 1994). Em um trabalho mais recente, Moreno et al. (2022) avaliou estirpes de *S. hyicus* isoladas de epidermite exsudativa de suínos do ano de 2012, e também encontrou níveis elevados de resistência para clindamicina, florfenicol, fluroquinolonas, tiamulina; e boa ação de beta-lactâmicos, gentamicina e sulfonamidas, em concordância com este estudo (MORENO et al., 2022).

As estirpes de *Streptococcus dysgalactiae* apresentaram resistência elevada aos antimicrobianos oxitetraciclina, florfenicol, quinolonas, clindamicina, tiamulina, espectinomicina e estreptomicina, e níveis moderados de resistência às fluorquinolonas, com mais de 50% das estirpes resistentes à marbofloxacina e enrofloxacina. Resultado muito semelhante foi encontrado por Moreno et al. (2016), cujas estirpes - isoladas de vários tecidos de suínos, incluindo descarga vulvar – foram resistentes às tetraciclina, danofloxacina, espectinomicina, tiamulina e clindamicina. De modo similar, os beta-lactâmicos apresentaram boa ação contra as estirpes de *S. dysgalactiae*, sendo que essa classe continua sendo a de escolha para o tratamento contra esse agente (BRANDT; SPELLERBERG, 2009; MORENO et al., 2016). Kiefer et al. (2021) relatam que *S. dysgalactiae* foi significativamente mais abundante em porcas com alto escore de prolapso de órgãos pélvicos, o que reforça a importância dessa espécie.

Além dos antimicrobianos citados anteriormente, as estirpes de *Corynebacterium diphtheriae* também apresentaram elevados níveis de resistência para tetraciclina e para clindamicina, corroborando resultados descritos por outros autores (FUNKE; PÜNTER; VON GRAEVENITZ, 1996; PEREIRA et al., 2008). Todas as estirpes foram sensíveis aos antimicrobianos beta-lactâmicos, corroborando resultados apresentados pelo nosso grupo em anos anteriores (POOR et al., 2017). Ainda, a resistência à clindamicina entre essas estirpes é provavelmente induzida pela resistência aos macrolídeos, determinando o fenótipo de resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B. Considerando que Schiller et al. descreveram a resistência à eritromicina mediada por plasmídeo de *C. diphtheriae* no início da década de 1980, pode-se sugerir que a resistência a macrolídeos/lincosamidas e tetraciclina poderia ser mediada por plasmídeo e, conseqüentemente, transmitida entre as estirpes. As elevadas taxas de resistência observada para tetraciclina, florfenicol e espectinomicina corroboram o amplo uso desses antimicrobianos na medicina veterinária, incluindo a suinocultura (DUTRA et al., 2021), e demandam

atenção para a implicação da infecção e tratamento relacionados a *Corynebacterium diphtheriae* tanto para humanos quanto para animais.

Neste estudo, as estirpes de *T. pyogenes* foram sensíveis aos beta-lactâmicos, florfenicol, gentamicina, tiamulina, clindamicina e às tetraciclinas; e elevada resistência foi verificada para espectinomicina, tildipirosina e tulatromicina. Esses resultados são similares a de Moreno et al. (2017), que também mostraram a sensibilidade de estirpes isoladas de abscessos pulmonares e cervicais aos beta-lactâmicos, florfenicol, gentamicina, e tiamulina, porém elevadas taxas de resistência para sulfonamidas, tetraciclina e clindamicina.

Já as estirpes de *Trueperella abortusuis* diferem das estirpes de *T. pyogenes* e das outras bactérias testadas por apresentaram um perfil de maior resistência, com taxas elevadas de resistência à cefalexina, a oxitetraciclina, ao florfenicol, às fluorquinolonas, às sulfonamidas e à clindamicina. Existem poucos relatos sobre o isolamento de *Trueperella abortusuis* e sua patogenia também é desconhecida. A maioria dos estudos, porém, confirma a presença desse agente em afecções do trato reprodutivo ou urinário de suínos (ÜLBEGI-MOHYLA et al., 2011; ALSSAHEN et al., 2020; JØRGENSEN et al., 2021), evidenciando sua importância e seu potencial papel nesses quadros.

2.7 Conclusão

A espectrometria de massa MALDI-TOF é um método rápido e de alto rendimento quando empregado na identificação de colônias bacterianas. O intenso crescimento bacteriano das amostras, mesmo com os cuidados adotados durante a coleta com espêculo e suabe estéreis, e até mesmo de fêmeas saudáveis, mostra que o canal vaginal da fêmea suína é intensamente colonizado por diferentes espécies. Algumas espécies bacterianas apresentaram frequência de isolamento semelhante em fêmeas com e sem descarga vulvar, no entanto, as espécies *Streptococcus dysgalactiae*,

Staphylococcus hyicus, *Corynebacterium diphtheriae*, *Trueperella pyogenes* e *Bacteroides pyogenes*, foram isoladas com elevada frequência somente nas fêmeas com descarga vulvar, e associadas entre si com maior frequência. Esses agentes também apresentaram elevados níveis de resistência para antimicrobianos largamente utilizados na suinocultura, como oxitetraciclina, florfenicol e espectinomicina, mas foram sensíveis aos beta-lactâmicos, sendo essa classe uma opção possível para o tratamento dessas infecções em suínos.

3. CAPÍTULO 2 - Caracterização das estirpes de *Escherichia coli*: fatores de virulência e perfil de resistência aos antimicrobianos.

3.1 Introdução

Escherichia coli é uma bactéria em forma de bastonete Gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. É mesófila, com crescimento ótimo a temperaturas entre 37° e 40° C e com tamanho variando de 1,1 a 1,5 µm por 2,0 a 6,0 µm, podendo ou não ser móvel. (SUSSMAN, 1997). É um agente comensal do trato gastrointestinal de diversos mamíferos e aves (SUSSMAN, 1997). Porém, algumas estirpes podem adquirir certos atributos de virulência, conferindo-lhes a capacidade de causar doença em seu hospedeiro. A este comportamento distinto entre as estirpes, presença de tais atributos e conforme o local de infecção, essas estirpes foram classificadas em patotipos (CROXEN; FINLAY, 2010).

Em suínos, *E. coli* é um dos principais agentes isolados nos casos de infecção urogenital e descarga vulvar (BARA et al., 1993; DE WINTER et al., 1995; GLOCK; BILKEI, 2005; ORAVAINEN et al., 2008; ISLING et al., 2010; KIRKWOOD et al., 2012). Por esse motivo, alguns estudos têm relacionado os fatores de virulência associados às infecções que acometem outros tecidos que não o intestino, como o trato reprodutivo, denominando o patotipo de estirpes de *Escherichia coli* extraintestinais patogênicas (ExPEC), cuja morbidade e mortalidade em humanos estão aumentando globalmente (POOLMAN; WACKER, 2016) e sua importância em suínos também vem sendo notada (KRAG et al., 2009; DING et al., 2012; TAN et al., 2012). Entretanto, ainda são poucos os trabalhos que caracterizaram de forma ampla os fatores de virulência de *E. coli* isoladas do trato geniturinário de fêmeas suínas.

Nesta seção do estudo, as estirpes de *E. coli* isoladas de porcas com e sem descarga vulvar purulenta foram avaliadas segundo a presença de 29 genes que

codificam fatores de virulência associados a ExPEC, e foram avaliadas quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos frequentemente usados em suínos.

3.2 Revisão de literatura

Existem dois grandes grupos para os patótipos de *E. coli*: os que causam infecção no intestino, ou diarreio gênicos; e o grupo das estirpes que causam infecção fora do ambiente intestinal, denominadas *E. coli* patogênicas extraintestinais (ExPEC).

O grupo diarreio gênico é subdividido nas seguintes classes: EPEC (*E. coli* enteropategênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), e DAEC (*E. coli* de aderência difusa) (CROXEN; FINLAY, 2010). Em suínos, o grupo mais importante entre as amostras diarreio gênicas é o das ETEC, que causa surtos de diarreia neonatal e diarreia pós-desmame (LUPPI, 2017).

O grupo ExPEC é dividido nos patótipos: UPEC (*E. coli* uropatogênica), SEPEC (*E. coli* septicêmica), NMEC (*E. coli* associada à meningite neonatal) e APEC (*E. coli* patogênica de aves) (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007; PITOUT, 2012). No cenário de descargas vulvares, é razoável ponderar que as estirpes isoladas desse ambiente sejam relacionadas às UPEC. Os fatores de virulência codificados pelas por esse grupo são numerosos e variam entre as estirpes - incluem principalmente adesinas e sistemas de captação de ferro que auxiliam na sobrevivência fora do intestino - e diferem daqueles que são expressos por estirpes diarreio gênicas, principalmente pela ausência do sistema de secreção tipo III, presente na maioria dos isolados intestinais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

No entanto, apenas a presença de um único fator de virulência não confere patogenicidade, mas sim uma combinação de fatores de virulência – adesinas, invasinas, evasinas, sideróforo e toxinas - e os níveis de expressão dos respectivos genes (PITOUT, 2012).

As adesinas são os fatores que permitem a adesão das bactérias em diferentes superfícies. São moléculas proteicas expressas na superfície bacteriana, geralmente formando filamentos – denominados fímbrias - e que reconhecem receptores nas células do hospedeiro (SIRLICI; TRABULSI, 2005). As principais adesinas presentes nas estirpes ExPEC/UPEC são as fímbrias do tipo 1 (*fim*), fímbrias P (*pap*), fímbrias S (*sfa*) e fímbrias F1C (*foc*) (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

As invasinas são proteínas da membrana externa de patógenos Gram-negativos que mediam a invasão das células do hospedeiro (OELSCHLAEGER, 2001; SIRLICI; TRABULSI, 2005). Entre os principais fatores está o IbeA, cujo gene codifica uma proteína importante na invasão de ExPEC na meningite neonatal de humanos e que também está associada à elevada patogenicidade em estirpes aviárias (GERMON et al., 2005; WANG et al., 2011).

Outro grupo importante de fatores de virulência são as evasinas, utilizadas para contornar as defesas do sistema imune do hospedeiro, como fagocitose, sistema complemento, linfócitos e anticorpos (SIRLICI; TRABULSI, 2005). Como exemplo, determinantes comuns de resistência ao sistema complemento em estirpes de *E. coli* são o antígeno capsular 1 (*kps*) e o gene que confere aumento da resistência sérica (*iss*) (NOLAN et al., 2003; BARNES; NOLAN; VAILLANCOURT, 2008). O antígeno capsular 1 são estruturas que recobrem a superfície bacteriana e dificultam a fixação do complemento (BIDET; BONARCORSI; BINGEN, 2012). Já o gene *iss* confere resistência às propriedades líticas do soro e se localiza na membrana externa das bactérias.

Os sistemas de aquisição de ferro são essenciais para a sobrevivência das estirpes de *E. coli* fora do ambiente intestinal. A concentração de ferro livre é extremamente baixa nos mamíferos quando fora do intestino, sendo aproximadamente 10^{-25} M no sangue e mais baixa em outros tecidos (FISCHBACH et al., 2006; WILES; KULESUS; MULVEY, 2008). Porém, grande parte das bactérias requerem uma concentração de aproximadamente 10^{-6} M de ferro citoplasmático para seu crescimento (ANDREWS;

ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003). Logo, as bactérias, em especial ExPEC, adquiriram diversos fatores para adquirir o ferro de seu hospedeiro, como a produção dos sideróforos, que são moléculas de baixo peso molecular com elevada afinidade por pelo íon férrico (Fe^{3+}) (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008). A afinidade do sideróforo da aerobactina pelo ferro, por exemplo, é muito maior do que a da transferrina - molécula utilizada pelos mamíferos para quelar o ferro livre no organismo – fazendo com que as bactérias possuidoras desse sistema tenham vantagem no sequestro desse íon (FISCHBACH et al., 2006; WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

As toxinas também são muito importantes para a patogenicidade das estirpes, uma vez que afetam uma variedade de processos celulares fundamentais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Entre os fatores toxigênicos mais comuns em ExPEC estão o fator citotóxico necrotizante (*cnf*), a toxina citoletal distensora (*cdt*), as hemolisinas (*hly*), a citotoxina entero-agregativa EAST-1(*ast*), e as toxinas auto transportadoras secretada (*sat*) e vacuolizadora (*vat*) (JOHNSON; RUSSO, 2005).

Em suínos, Brito et al., (1999) avaliaram estirpes de *E. coli* isoladas de fêmeas com infecção urinária e observaram que o gene *pap* que codifica para a fímbria P, associada com infecções urinárias, esteve presente em 54,8% dessas estirpes. No entanto, fatores de virulência relacionados à colibacilose entérica, como as toxinas termoestáveis e termolábeis (ST e LT) e a verotoxina (VT) foram encontrados em menor proporção (DE BRITO et al., 1999). De maneira similar, Spindola et al., (2018) encontrou elevadas frequências de genes relacionados a infecções extraintestinais em estirpes de *E. coli* isoladas de porcas com infecção urinária, sendo que 78,5% e 58% das estirpes analisadas apresentavam os genes que codificam para as fimbrias do tipo F1C e P, respectivamente, relacionadas às infecções do trato urinário. Ainda, 23% delas apresentavam o fator citotóxico *cnf1* e 98% das estirpes apresentavam fenótipo de multirresistência aos antimicrobianos (SPINDOLA et al., 2018a).

Visto que, no presente estudo, *E. coli* foi intensamente isolada a partir das amostras coletadas de canal vaginal, as estirpes obtidas foram submetidas à detecção de genes

de virulência considerados importantes para a colonização e infecção do trato geniturinário e a determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos,

3.3 Objetivos

Caracterizar as estirpes de *Escherichia coli* isoladas de fêmeas com descarga vaginal e de fêmeas saudáveis de acordo com a presença de genes codificadores de fatores de virulência, entre eles: adesinas, invasinas, evasinas, sideróforo e toxinas - e determinar para essas estirpes o perfil de resistência aos antimicrobianos.

3.4 Material e métodos

3.4.1 Isolados

Foram avaliadas 190 estirpes de *E. coli* isoladas de 130 animais com descarga vaginal e também de fêmeas saudáveis

3.4.2 Extração do DNA e reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Para a pesquisa de genes de virulência extra intestinais de *Escherichia coli*, as colônias isoladas tiveram seu DNA extraído de acordo com o protocolo descrito por Boom et al., (1990). As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até o processamento. Foram avaliados 29 genes que codificam para fatores de virulência associados a ExPEC. Os iniciadores de cada gene e as referências estão descritos no Quadro 2.

Os fragmentos amplificados foram detectados por meio da eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com BlueGreen® (LGC Biotecnologia). As imagens foram capturadas sob iluminação UV pelo sistema Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories). Os fragmentos foram identificados com base no marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (LGC Biotecnologia).

Gráficos do tipo *upset plot*, para a representação dos perfis de virulência das estirpes de *Escherichia coli*, foram feitos com o pacote *Complex Heatmap* (Gu, Z., 2016), no software R-Studio (R Core Team, 2020).

Quadro 2: Iniciadores utilizados para amplificar os genes codificadores de fatores de virulência de *E. coli* relacionados a infecções extra intestinais.

Gene	Sequência de <i>primers</i> (5'-3')	<i>Amplicon</i> (bp)	Referências
<i>papC</i>	TGATATCACGCAGTCAGTAGC CCGGCCATATTCACATAA	501	JANBEN, 2001
<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177	YAMAMOTO et al., 1995
<i>cnf1</i>	AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG CATTGAGAGTCCTGCCCTCATTATT	498	YAMAMOTO et al., 1995
<i>Sat</i>	TGCTGGCTCTGGAGGAAC TTGAACATTCAGAGTACCGGG	667	EWERS et al., 2007
<i>vat</i>	TCCTGGGACATAATGGTCAG GTGTCAGAACGGAATTG	981	EWERS et al., 2004
<i>iucD</i>	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG	602	YAMAMOTO et al., 1995
<i>iss1</i>	GTGGCGAAAAGTAGTAAAACAGC CGCCTCGGGGTGGATAA	760	HORNE et al., 2000
<i>iss2</i>	CAGCAACCCGAACCACTTGATG AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	323	JOHNSON; WANNEMUEHLER; NOLAN, 2008
<i>lrp2</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTGCGGCAGCGTTTCTTCT	281	SCHUBERT et al., 1998
<i>fyuA</i>	GCGAC GGAAGCGA TTTA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	780	SCHUBERT et al., 1998
<i>usp</i>	ACATTCACGGCAAGCCTCAG AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC	440	BAUER et al., 2002
<i>neuS</i>	TATAATTAGTAACCTGGGGC GGCGCTATTGAATAAGACTG	927	TSUKAMOTO, 1997
<i>cvi/cva</i>	TCCAAGCGGACCCCTTATAG CGCAGCATAGTTCCATGCT	598	EWERS et al., 2007
<i>astA</i>	TGCCATCAACACAGTATATCC TAGGATCCTCAGGTCGCGAGTGACGGC	116	YAMAMOTO; ECHEVERRIA, 1996
<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	JOHNSON; STELL, 2000

<i>kpsMT-II</i>	GCGCATTTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	272	JOHNSON; STELL, 2000
<i>kpsMT-III</i>	TCCTCTTGCTATTATCCCCCT AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC	392	JOHNSON, 2000
<i>crl</i>	TTTCGATTGTCTGGCTGTATG CTTCAGATTCAGCGTCGTC	250	MAURER et al., 1998
<i>csgA</i>	ACTCTGACTTGACTATTACC AGATGCAGTCTGGTCAAC	200	MAURER et al., 1998
<i>afaBC</i>	GCTGGGCAGCAAACCTGATAACCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCG	750	YAMAMOTO et al., 1995
<i>hlyF</i>	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC GGCGTTTAGGCATTCCGATACTCAG	450	JOHNSON et al., 2008
<i>iroN</i>	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT GTTCGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT	553	JOHNSON et al., 2006
<i>ibeA</i>	TGGAACCCGCTCGTAATATAC CTGCCTGTTCAAGCATTGCA	342	EWERS et al., 2004
<i>sfa</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	JOHNSON, 2000
<i>focH</i>	ATGCGTAAATATTATCCCCTC GCCACCTGTCTGGATATAGAC	603	KRAG et al., 2009
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	JOHNSON, 2000
<i>cdtB</i>	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTTA	430	JOHNSON, 2000
<i>afa</i>	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	559	JOHNSON, 2000
<i>papE</i>	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	336	JOHNSON, 2000

3.4.3 Caracterização do perfil de resistência aos antimicrobianos para as estirpes de *Escherichia coli*

A caracterização do perfil de resistência a antimicrobianos foi realizada pelo teste de microdiluição em caldo, conforme os padrões definidos no documento VET01 (CLSI, 2020). Para a preparação do inóculo, as estirpes foram cultivadas em caldo BHI (Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas. A turbidez do cultivo foi ajustada com

solução salina estéril (0,9%) de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland e confirmada em espectrofotômetro (0,150 a 600 nm). Esta suspensão bacteriana ajustada possui aproximadamente $1,0$ a $2,0 \times 10^8$ UFC/ml, que foi novamente diluída na ordem de 1:1000 em caldo Mueller Hinton II (Difco) de maneira a obter uma concentração final de, aproximadamente, $5,0 \times 10^5$ UFC/ml. Posteriormente, 50 μ l desta suspensão final foram distribuídos em cada poço da microplaca, que foi selada e incubada a 37°C por 24 horas. Para as estirpes de *Escherichia coli*, os princípios testados foram ceftiofur, amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, cefalexina, oxitetracilina, florfenicol, marbofloxacina, enrofloxacina, ciprofloxacina, gentamicina, neomicina, espectinomicina, estreptomicina, sulfametoxazol, sulfametoxazol + trimetoprima, azitromicina, colistina e fosfomicina.

As concentrações inibitórias mínimas foram aferidas visualmente como as menores contrações dos antimicrobianos nos poços sem crescimento bacteriano (sem a formação de botão). Foi utilizada como controle interno a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. As CIM₅₀ e CIM₉₀ foram determinadas conforme prescrito por (SCHWARZ et al., 2010).

3.4.4 Análise estatística

A significância dos resultados foi estabelecida por meio do Teste exato de Fisher (bicaudal); ou Qui-quadrado com correção de Yates se as ocorrências em todos os grupos foram maiores que cinco. O nível de significância estatística foi determinado quando $p < 0,05$.

3.5 Resultados

3.5.1 Pesquisa de genes de virulência associados a ExPEC

Um total de 190 estirpes isoladas de 130 animais foram submetidas à pesquisa de genes de virulência relacionados à infecção extraintestinal. Os genes testados e suas frequências estão apresentados na tabela 11. O gene mais frequente foi *iutA*, presente em todas as estirpes tanto em fêmeas com descarga vulvar quanto em fêmeas saudáveis, seguido pelos genes *iucD*, *csgA*, *iss2* e *astA*. Em todas as estirpes testadas foi detectado pelo menos dois dos 29 genes testados, e uma mediana de sete genes de virulência para as estirpes de fêmeas com descarga vulvar, contra a mediana de seis genes para as estirpes de fêmeas saudáveis. Em 72,8% (115/158) e 65,6% (21/32) das estirpes de fêmeas com descarga vulvar e saudáveis, respectivamente, foram detectados pelo menos seis genes de virulência extraintestinais. As figuras 9 e 10 mostram os perfis de virulência com pelo menos duas ocorrências para ambos os grupos.

Houve diferença para a frequência de alguns genes de virulência entre os grupos de fêmeas do grupo DV e do grupo SD (Tabela 12). As porcas com descarga vulvar purulenta tiveram maior frequência dos genes *irp2*, *iroN*, *cvi/cva*, *papC* e *sat*, enquanto fêmeas saudáveis apresentaram maior frequência do gene *astA*. O gene *usp* (*Uropathogenic Specific Protein*), comumente encontrado em estirpes uropatogênicas em humanos (NIPIC et al., 2013), teve baixa frequência em ambos os grupos, mas foi mais frequente nas fêmeas com descarga vulvar (8,2%) quando comparado às saudáveis (3,1%), mas a diferença não foi significativa.

Tabela 11: Frequência de estirpes positivas para os genes codificadores de fatores de virulência para infecção extraintestinal.

Gene	Frequência (%)	
	Descarga vulvar (n = 158)	Saudáveis (n = 32)
<i>iutA</i>	100,0%	100,0%
<i>iucD</i>	93,7%	96,9%
<i>csgA</i>	63,3%	84,4%
<i>iss2</i>	58,2%	90,6%
<i>irp2</i>	55,7%	9,4%
<i>iroN</i>	55,1%	9,4%
<i>astA</i>	46,2%	78,1%
<i>hlyF</i>	37,3%	28,1%
<i>crl</i>	37,3%	43,8%
<i>fimH</i>	32,9%	21,9%
<i>cvi/cva</i>	28,5%	6,3%
<i>papC</i>	25,3%	0,0%
<i>sat</i>	17,7%	0,0%
<i>focH</i>	11,4%	15,6%
<i>iss1</i>	10,1%	18,8%
<i>sfa</i>	9,5%	12,5%
<i>usp</i>	8,2%	3,1%
<i>kpsMTII</i>	8,2%	0,0%
<i>neuS</i>	3,8%	0,0%
<i>vat</i>	3,2%	0,0%
<i>ibeA</i>	3,2%	0,0%
<i>hlyA</i>	1,9%	3,1%
<i>cdtB</i>	1,3%	0,0%
<i>cnf1</i>	0,6%	0,0%
<i>fyuA</i>	0,0%	0,0%
<i>afa</i>	0,0%	0,0%
<i>afabc</i>	0,0%	0,0%
<i>papE</i>	0,0%	0,0%
<i>kpsMTIII</i>	0,0%	0,0%

Tabela 12: Valor-*p* do teste exato de Fisher ou χ^2 para os principais genes de virulência detectados entre os isolados de *E. coli* de fêmeas dos grupos DV e SD.

Gene	Descarga vulvar (DV)	Saudáveis (SD)	Valor-<i>p</i> teste exato de Fisher
<i>irp2</i>	88/158 (55,7%)	3/32 (9,4%)	<0,001
<i>iroN</i>	87/158 (55%)	3/32 (9,4%)	<0,001
<i>astA</i>	85/158 (53,8%)	25/32 (78,1%)	0,002
<i>cvi/cva</i>	45/158 (28,5%)	2/32 (6,2%)	0,01
<i>papC</i>	40/158 (25,3%)	0/32	0,001
<i>sat</i>	28/158 (17,7%)	0/32	0,01

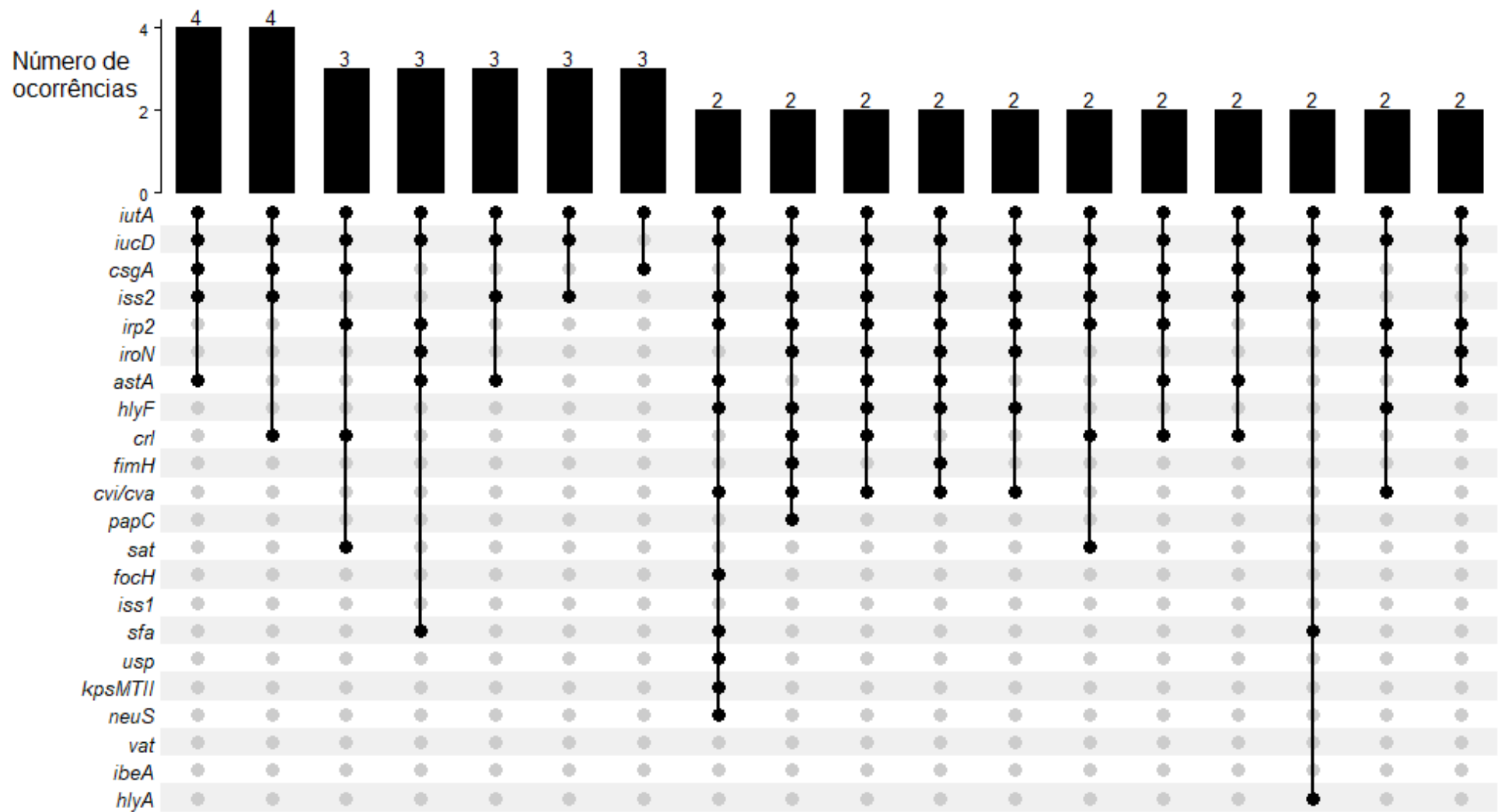


Figura 9: UpSet plot para o número de ocorrências de cada perfil de virulência das estirpes de *Escherichia coli* isoladas de fêmeas com descarga vulvar purulenta (n = 158).

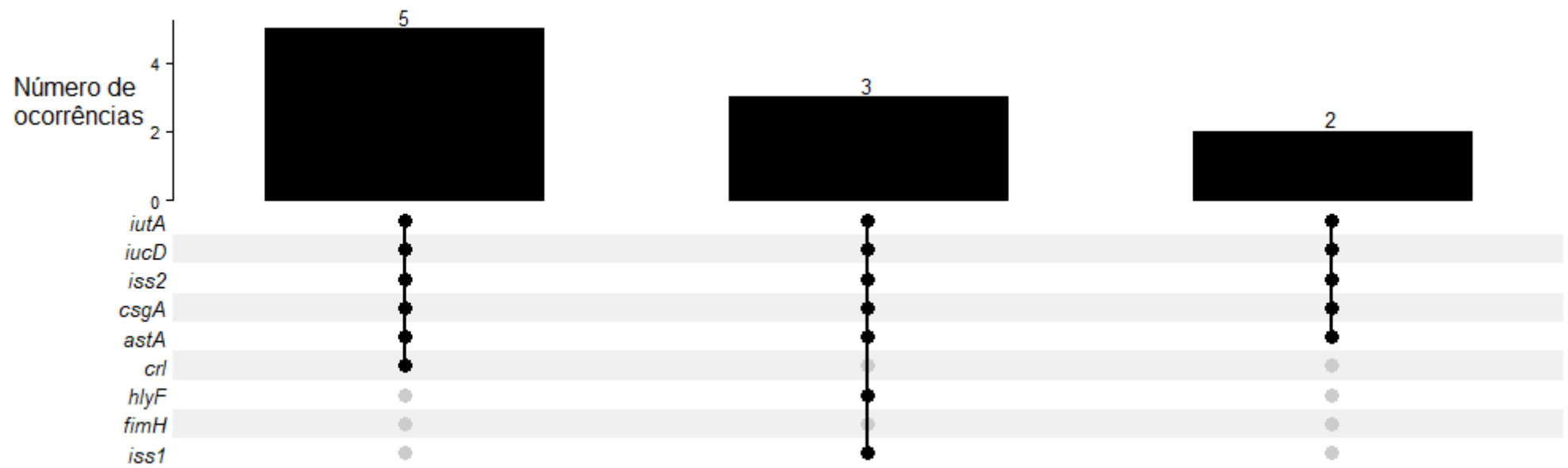


Figura 10: *UpSet plot* para o número de ocorrências de cada perfil de virulência das estirpes de *Escherichia coli* isoladas de fêmeas saudáveis (n = 32).

3.5.2 Perfil de resistência aos antimicrobianos para as estirpes de *Escherichia coli*

Foram avaliadas 160 estirpes de *E. coli* (pelo menos uma estirpe para cada animal positivo para o isolamento do agente), as quais apresentaram elevada frequência de resistência à diversas classes de antimicrobianos (Tabela 12). As estirpes apresentaram maior frequência de resistência para ciprofloxacina, estreptomicina, cefalexina, florfenicol e ampicilina. Com exceção da estreptomicina, a classe dos aminoglicosídeos (gentamicina, neomicina e espectinomicina) apresentaram boa ação contra as estirpes de *E. coli*, juntamente com a colistina, a fosfomicina e o ceftiofur. Uma vez que as estirpes dessa espécie foram isoladas em grande número, o gráfico da Figura 11 mostra o perfil de resistência dentro de cada granja.

Tabela 12: Distribuição dos valores de CIM, valores de CIM 50, CIM 90 e taxa de resistência identificada entre as estirpes de *E. coli*.

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)																CIM*50 (µg/m)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
	≤0,06	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512			
Ceftiofur				119	27	2	0	0	1	11							≤0,25	0,5	7,5
Ampicilina						4	17	6	4	2	1	1	125				>64	>64	79,4
Cefalexina				2	0	0	0	28	91	19	6	14					8	32	81,3
Oxitetraciclina								29	5	0	0	126					>32	>32	78,8
Florfenicol				1	0	3	28	14	114								>8	>8	80,0
Marbofloxacina	4	0	1	19	28	23	8	9	68								2	>4	48,1
Enrofloxacina				17	24	27	10	7	75								4	>4	51,3
Ciprofloxacina						4	14	21	121								>4	>4	88,8
Gentamicina				105	20	5	2	5	9	14							≤0,5	16	14,4
Neomicina								142	1	4	13						≤4	16	11,3
Espectinomicina									71	56	18	7	5	3			16	32	5,0
Estreptomicina						1	11	14	1	4	129						>16	>16	83,8
Sulfametoxazol													55	47	54	4	256	512	36,3
Azitromicina								44	36	12	11	10	47				8	>64	42,5
Colistina						70	81	5	0	1	3						2	2	5,6
Fosfomicina									141	5	0	1	5	1	1	6	≤8	16	5,0

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)										CIM*50 (µg/mL)	CIM*90 (µg/mL)	Res %
	≤1/0,5	1/0,5	2/1	4/2	8/4	16/8	32/16	64/32	>64/32				
Amox/Ác. clavulânico	2	0	2	12	14	26	89	10	5		32/16	32/16	65,0
	≤1/19	1/19	2/38	4/76	>4/76	-	-	-	-				
Trimetoprima/ sulfametoxazol	121	0	0	0	39						≤1/9	>4/76	24,4

Escherichia coli

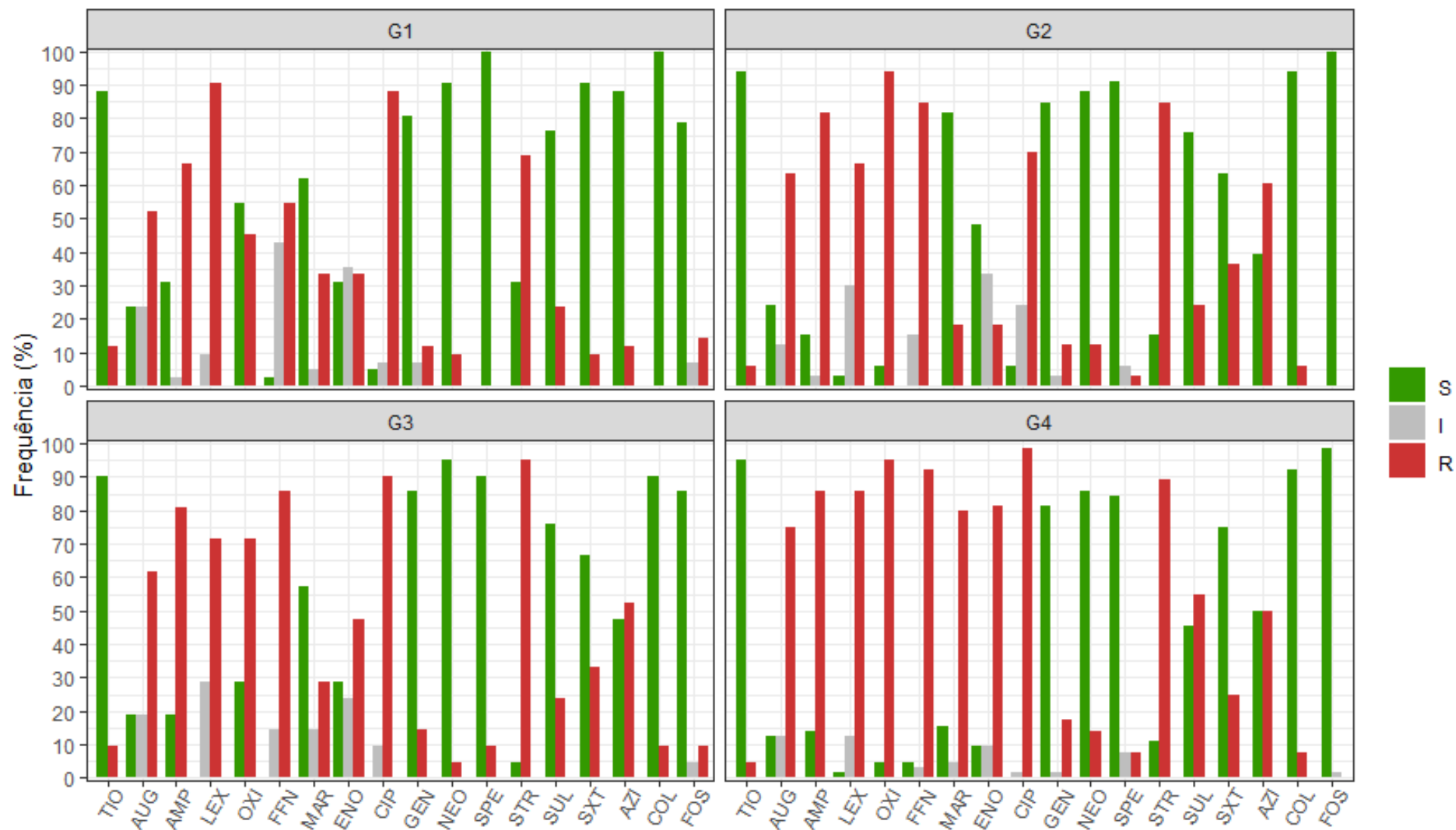


Figura 11: Perfil de resistência das estirpes de *Escherichia coli* aos para cada granja estudada. TIO – Ceftiourfur; AUG – Amoxicilina + clavulanato; AMP – Ampicilina; LEX – Cefalexina; OXI – Oxitetraciclina; FFN – Florfenicol; MAR – Marbofloxacina; ENO – Enrofloxacina; CIP – Ciprofloxacina; GEN – Gentamicina; NEO – Neomicina; SPE – Espectinomicina; STR – Estreptomicina; SUL – Sulfametoxazol; SXT – Sulfadimetoxina + trimetoprima; AZI – Azitromicina; COL – Colistina; FOS – Fosfomicina

3.6 Discussão

As estirpes de *E. coli* isoladas apresentaram uma alta taxa dentre os genes de virulência extra intestinais pesquisados. Esses fatores são importantes na colonização e na ascensão da bactéria no trato geniturinário (WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

Os genes *iutA* e *iucD*, que fazem parte do sistema de aquisição de ferro, foram os mais prevalentes, com o *iutA* sendo detectado em 100% das estirpes de fêmeas com e sem descarga vulvar purulenta. Esses genes são responsáveis pela síntese do receptor (*iutA*) e do sideróforo (*iucD*) da aerobactina. O *irp2*, também envolvido na captação de ferro, apresentou alta prevalência nas estirpes de porcas do grupo DV e menor prevalência nas do grupo SD (55,7% vs 9,4%, $p < 0.05$), assim como o gene *iroN* (55,1% vs. 9,4%, $p < 0.05$). Esses genes são importantes por auxiliar na sobrevivência da bactéria fora do intestino, permitindo a colonização de outros tecidos, onde a disponibilidade de ferro não é tão alta (DER VARTANIAN et al., 1992). Já os genes *iss1* e *iss2*, presentes em grande parte das estirpes de ambos os grupos, estão relacionados à maior resistência sérica. A associação do operon da aerobactina (*iucD* e *iutA*) com o gene *iss* estão relacionados a elevados níveis de virulência, e mesmo a posse de qualquer um desses genes é suficiente para níveis intermediários de virulência em APEC (TIVENDALE et al., 2004). Porém, os genes *cvi/cva*, *kpsMT2* e *neuS*, à capacidade de superar as defesas do hospedeiro (JOHNSON; WANNEMUEHLER; NOLAN, 2008; SIRLICI; TRABULSI, 2005) foram mais prevalentes em fêmeas com descarga vulvar. O gene *cvi/cva* é um marcador de um plasmídeo de virulência, e teve frequência significativamente maior nas

estirpes de porcas do grupo DV. A presença desses genes indica que essas estirpes podem apresentar uma característica mais invasiva e virulenta.

Dos fatores que codificam fímbrias importantes na adesão e colonização do epitélio urinário, o gene *focH* foi encontrado tanto em fêmeas do grupo DV como do grupo SD, mas em baixa prevalência. Já o gene *papC* esteve presente em 25,3% das estirpes isoladas, e não foi detectado nas estirpes de fêmeas do grupo SD. O fator citotóxico necrotizante 1 (*cnf1*) e a α -hemolisina (*hlyA*) tiveram uma prevalência mais baixa tanto nas fêmeas com descarga vulvar, quanto nas saudáveis. No entanto, o gene *cnf1* foi detectado apenas no grupo com descarga vulvar. Spindola et al. (2018) encontraram prevalência mais elevada para esse gene em estirpes UPEC isoladas de suínos, mas prevalência semelhante de *hlyA*. Os mesmos autores também encontraram prevalências mais baixa para o gene *iucD*, relacionado a aquisição de ferro.

O gene da toxina EAST1 (*astA*), embora esteja associado à diarreia em humanos e animais, também é encontrado em ExPEC de humanos e APEC (*E. coli* patogênica aviária), é um gene conservado das estirpes diarreiogênicas (MALUTA et al., 2016) e está presente em grande parte das estirpes, com maior prevalência nas fêmeas do grupo SD. Segundo Maluta et al. (2016), as sequências desse gene em ExPEC é similar à encontrada nas estirpes diarreiogênicas, mas também carregam mutações que podem alterar a sua função, argumentando que esse gene pode ter funções que vão além da virulência, especialmente em estirpes extraintestinais.

Os genes *sat* e *vat* que também codificam para toxinas foram encontrados em baixa prevalência em ambos os grupos. Apesar disso, o gene *sat* foi detectado com maior frequência nas fêmeas do grupo SD.

Em relação aos perfis de virulência, observou-se que para ambos os grupos a associação *iutA+iucD+csgA+iss2+astA* foi muito recorrente. As fêmeas com descarga vulvar purulenta, porém, apresentaram maior variedade de perfis diferentes e com até 14 genes de virulência associados (*astA + iss1 + iss2 + irp2 + iutA + iucD + iroN + sfa + hlyF + papC + focH + fimH + cdtB + csgA*), enquanto as saudáveis apresentaram menor número de perfis, com no máximo 11 genes associados (*astA + iss1 + iss2 + iutA + iucD + cvi/cva + iroN + hlyF + fimH + crl + csgA*). No entanto, a presença de apenas alguns genes de virulência e em associação - como os genes do sideróforo da aerobactina e os genes de resistência sérica *iss* - pode caracterizar estirpes de virulência intermediária (TIVENDALE et al., 2004), perfil que ocorreu tanto em fêmeas do grupo DV quanto em fêmeas SD. Assim, é possível discutir que não somente a presença dos genes virulência e seus níveis de expressão são necessários para que ocorra doença (PITOUT, 2012), mas também as condições do habitat, no caso o trato genital, com presença associação entre bactérias e consequente desequilíbrio da microbiota, que podem ser importantes para o surgimento clínico da infecção. As informações do sequenciamento e caracterização da microbiota desses animais poderá auxiliar no entendimento desses quadros.

As estirpes de *Escherichia coli* testadas apresentaram elevada resistência para alguns antimicrobianos, como ciprofloxacina, estreptomicina, cefalexina, florfenicol, tetraciclina e ampicilina, com alguns desses sendo frequentemente utilizados na suinocultura (DUTRA et al., 2021), inclusive para o tratamento de infecções geniturinárias. Resultados semelhantes foram encontrados por Spindola et al., (2018), que também encontrou elevada resistência de UPEC à tetraciclina, florfenicol e ampicilina, porém foram sensíveis ao ceftiofur,

gentamicina, espectinomocina e à amoxicilina + ácido clavulânico. Em contraste, 65% das estirpes deste estudo apresentaram resistência à amoxicilina + ácido clavulânico.

Das 160 estirpes testadas, 149 (93,1%) foram classificadas como multirresistentes - – resistentes a pelo menos um antimicrobiano em mais de três classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012). É importante ressaltar que alguns desses antimicrobianos são considerados de importância crítica em medicina humana, como cefalexina e a ciprofloxacina (WHO, 2018).

3.1 Conclusão

A presença de vários dos genes de virulência testados, alguns em elevada frequência, indica que as estirpes de *E. coli* isoladas do canal vaginal de porcas possuem os fatores que caracterizam *E. coli* extraintestinais patogênicas (ExPEC) e têm potencial para causar infecção. As estirpes isoladas de fêmeas com descarga vulvar ainda apresentam uma frequência significativamente maior de alguns desses genes em relação as porcas saudáveis, como os genes *irp2*, *cvi/cva*, *papC* e *sat*, e que podem servir como marcadores de infecção. Os elevados níveis de resistência observados, com mais de 90% das estirpes sendo classificadas como multirresistentes é um forte indicador do uso indiscriminado de antimicrobianos em suínos.

4. CAPÍTULO 3 – Caracterização da microbiota do canal vaginal de fêmeas com e sem descarregar vulvar purulenta por meio da metagenômica do gene 16S rRNA

4.1 Introdução

As descargas vulvares purulentas causadas por infecções bacterianas estão associadas à diminuição do desempenho reprodutivo das porcas (WENTZ et al., 1986; MAES; VERDONCK; KRUIF, 1999; KIRKWOOD et al., 2012). A metrite e a endometrite são a causa mais comum dessas descargas purulentas (KIRKWOOD et al., 2012) e são uma importante fonte de descarte e mortalidade de porcas, que está aumentando em todo o mundo (CHINA SUPAKORN, 2019).

Embora alguns estudos tenham se dedicado a caracterizar a população bacteriana do canal vaginal nos últimos anos, a maioria destes estudos se baseia nos métodos tradicionais de cultura e isolamento de agentes (SCOFIELD; CLEGG; LAMMING, 1974; BARA et al., 1993; DE WINTER et al., 1995). No entanto, esses métodos podem levar a um viés na caracterização da microbiota, uma vez que muitos microrganismos tem crescimento dificultado ou não crescem nos meios de cultura sintéticos (HUGENHOLTZ; TYSON, 2008).

Os estudos utilizando RNA ribossômico como marcador evolutivo nos trabalhos de Carl Woese e George Fox, na década de 1970, revolucionaram a microbiologia evolutiva, taxonômica e ecológica, e mesmo a microbiologia como um todo, com destaque para o sequenciamento do gene 16S rRNA (WOESE; FOX, 1977; ZHULIN, 2016). Mais recentemente, os avanços tecnológicos permitiram uma drástica diminuição dos custos de sequenciamento, principalmente devido ao surgimento de plataformas comerciais de sequenciamento de alto rendimento, como a Illumina® (REUTER; SPACEK;

SNYDER, 2015). Assim, a caracterização da microbiota por meio do sequenciamento de nova geração, que independe dos métodos de cultura tradicionais, tem se tornado cada vez mais acessível e trouxe novos entendimentos sobre a população bacteriana residente em diversos órgãos e tecidos, bem como o seu papel na saúde e nas doenças de humanos e animais (WHITE et al., 2011; GREEN; ZAREK; CATHERINO, 2015; ATA et al., 2019; PASCOTTINI et al., 2020; KIEFER et al., 2021).

A microbiota consiste no conjunto de todos os microrganismos que ocupam um habitat bem definido (BERG et al., 2020) - como exemplo a microbiota do canal vaginal, microbiota fecal, microbiota da pele entre outros – e tem um papel importante na manutenção da saúde do indivíduo, uma vez que pode agir como uma barreira biológica contra a adesão de patógenos, ou secretando componentes antimicrobianos que mantêm o equilíbrio do habitat (OAKLEY et al., 2008; LAMONT et al., 2011; LIU et al., 2019).

Diversos fatores podem ser responsáveis pela alteração da composição da microbiota, como condições estressantes ou exposição a um patógeno específico (SONG et al., 2017; HE et al., 2019). Essa alteração pode levar ao desequilíbrio da microbiota, condição conhecida como disbiose, e que pode impactar negativamente o sistema imune abrindo brechas para o surgimento de patógenos oportunistas (BERG et al., 2020).

4.2 Revisão de literatura

Poucos trabalhos caracterizaram a microbiota vaginal de porcas por meio de métodos baseados em sequenciamento de nova geração (SANGLARD et al., 2020b; KIEFER et al., 2021; LUQUE et al., 2021; XU et al., 2021), e ainda menos de porcas com descarga vulvar purulenta (WANG et al., 2017; ZHANG et al.,

2021). Sanglard et al., (2020b, 2020a) investigou a relação entre a microbiota vaginal de porcas com o genótipo, com o desempenho reprodutivo e com a resposta à vacinação dos animais contra a síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRS) nos Estados Unidos, mas sem relacionar com infecções ou descarga vulvar. Em contrapartida, em um estudo realizado na China, Wang et al., (2017) comparou a microbiota vaginal de porcas com e sem endometrite e encontrou algumas diferenças entre esses grupos, observando os gêneros *Escherichia-Shigella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Clostridium* em maior abundância relativa nas fêmeas com endometrite. Vale ressaltar, porém, que no estudo de Wang et al. (2017) poucos animais foram avaliados, com apenas quatro animais em cada grupo. Zhang et al. (2021) investigaram o efeito da microbiota intestinal na composição bacteriana do canal vaginal de porcas e indicaram que alguns gêneros como *Escherichia-Shigella* e *Bacteroides* podem estar relacionados ao estabelecimento da endometrite. Até o momento, não existem estudos caracterizando a microbiota vaginal de fêmeas suínas no Brasil.

Devido à escassez de dados mais recentes sobre os principais agentes bacterianos envolvidos nas infecções urogenitais que causam descarga vulvar, e à ausência de estudos mais completos quanto à caracterização da microbiota vaginal de porcas com esse sinal clínico, este trabalho visa preencher essa lacuna na pesquisa de agentes infecciosos que causam grande impacto na produção de suínos e de potencial impacto em saúde pública. A complementação dos resultados de isolamento com a análise metagenômica de fêmeas com e sem sinais de metrite será de extrema importância para que sejam avaliadas as espécies bacterianas que estão diretamente relacionadas à

infecção, não apenas à microbiota reprodutiva, principalmente a partir da quantificação desses agentes nas respectivas amostras.

4.3 Objetivos

Caracterizar e realizar a quantificação relativa dos agentes bacterianos que compõe a microbiota do canal vaginal de porcas com e sem descarga vulvar purulenta, por meio da metagenômica do gene 16S rRNA.

4.4 Material e métodos

4.4.1 Extração de DNA e análise metagenômica do gene 16S rRNA

Para as amostras que foram submetidas a análise metagenômica, os suabes tiveram seu DNA extraído utilizando o kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração final e a qualidade do DNA das amostras foram aferidas no equipamento NanoDrop® 2000, antes de serem enviadas para o sequenciamento. Para o sequenciamento, fornecido pela empresa GenOne (Rio de Janeiro), realizou-se o preparo das bibliotecas *paired-end* de 250 pb da região V3-V4 do gene 16S rRNA, utilizando os iniciadores 341F e 806R, com posterior sequenciamento em plataforma Illumina®. Um total de 72 amostras foram sequenciadas, sendo 40 de fêmeas com descarga vulvar purulenta e 32 de fêmeas saudáveis. As análises foram realizadas utilizando a plataforma QIIME™2 (BOLYEN et al., 2019). No tratamento das *reads*, a remoção de iniciadores foi realizada com a ferramenta *cutadapt* (MARTIN, 2011), a união dos pares de *reads* foi realizada com o plugin *Vsearch* (ROGNES et al., 2016) e um filtro de qualidade foi aplicado por meio do plugin *quality-filter* com o método *q-score-joined* (BOKULICH et al., 2013). A

redução de ruído foi realizada com o plugin *deblur*, com o método *denoise-16S* (AMIR et al., 2017). Sequências com $\geq 97\%$ ou mais de similaridade foram atribuídas à mesma OTU (Unidade Taxonômica Operacional) e foram classificadas taxonomicamente de acordo com o banco de dados SILVA (QUAST et al., 2012). Figuras e gráficos foram realizados com o pacote *qiime2R* (JORDAN; BISANZ, 2018), *ggVennDiagram* (GAO; YU; CAI, 2021) e *ggplot2* (WICKHAM, 2009) no software R-Studio (R Core Team, 2020).

4.4.2 Análise estatística

Para análise estatística de diversidade alfa comparando os grupos de fêmeas com descarga vulvar e saudáveis, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%.

Para a comparação da diversidade beta, foi realizada a análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), com 999 permutações. Foi considerado um nível de significância de 5% para o valor-*p* ajustado à taxa de falsa descoberta (valor-*q*). A análise de abundância diferencial foi realizada usando o teste ANCOM (Analysis of Composition of Microbiomes) (MANDAL et al., 2015).

4.5 Resultados

4.5.1 Sequenciamento

O sequenciamento do gene 16S rRNA em plataforma Illumina® das 72 amostras gerou um total de 3.760.359 *reads*. O número médio de *reads* por amostra foi de 39.233, com um máximo de 216.213 e um mínimo de 3.276 *reads*. Após o controle de qualidade das sequências, redução e agrupamento dos *amplicons* com $\geq 97\%$ ou mais de similaridade, um total de 1.068 OTU's foram obtidas.

4.5.2 Análise de diversidade alfa e beta

Uma análise primária foi realizada para comparar a diversidade bacteriana entre as granjas estudadas. As granjas 1 e 3 (G1 e G3) apresentaram maior riqueza quando comparadas com G2 e G4 ($p < 0.001$, índice Chao1, Figura 12-A). Entretanto, apenas a G3 apresentou maior diversidade em relação à todas as outras granjas. ($p < 0.01$, índice Shannon, Figura 12-B).

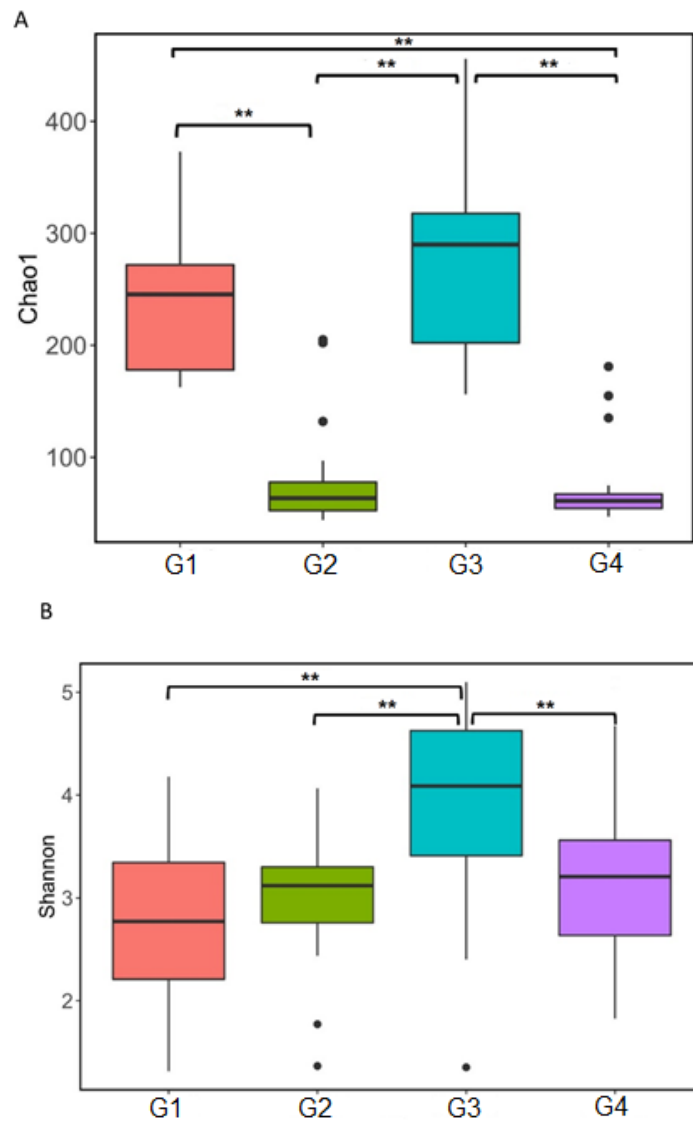


Figura 12: Boxplot de alfa-diversidade para os índices (A) Chao1 e (B) Shannon para cada uma das granjas estudadas. **Indica diferença significativa entre as granjas (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,01$).

Também houve diferença em beta-diversidade para a comparação entre granjas. A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) para o índice UniFrac revelou que G1 e G2 não apresentaram diferença na composição bacteriana de suas amostras, enquanto os outros pareamentos (G1 vs. G3; G1 vs. G4; G2 vs. G3; G2 vs. G4; G3 vs. G4) indicaram diferença significativa entre a composição bacteriana entre tais granjas (PERMANOVA, $p < 0,05$ e $q < 0,05$, Figura 13).

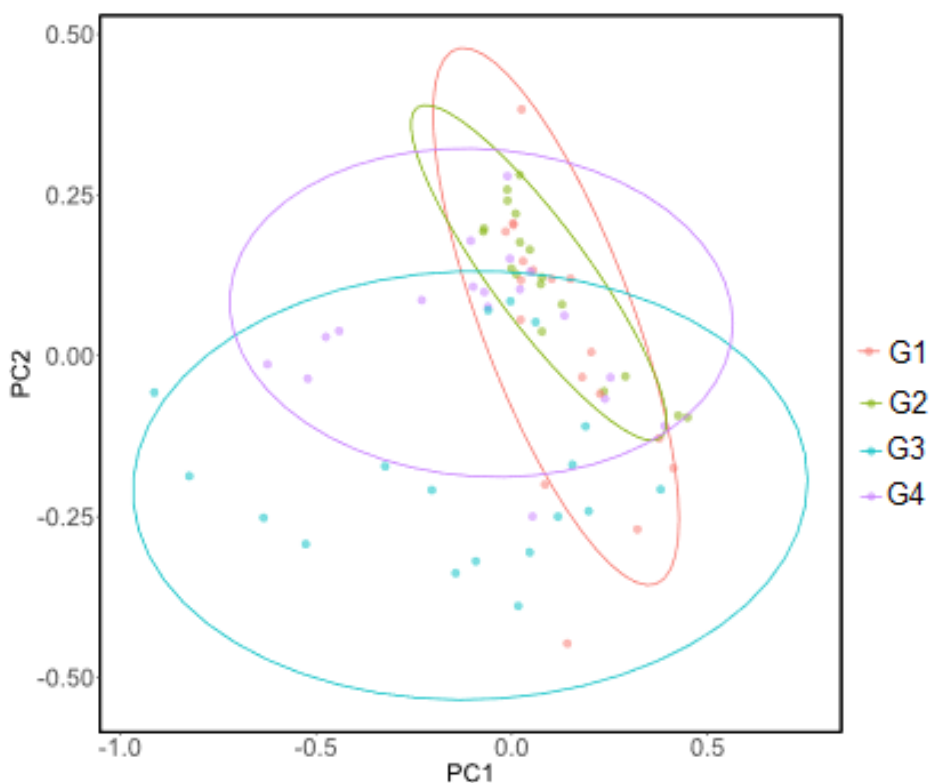


Figure 13: Gráfico de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) para o índice UniFrac entre as granjas estudadas. As granjas G1 e G2 não diferiram na composição da microbiota, mas diferenças foram observadas entre G1 vs. G3, G1 vs. G4, G2 vs. G3, G2 vs. G4 e G3 vs. G4 (PERMANOVA, $p < 0,05$; $q < 0,05$).

Como houve diferença de diversidade entre granjas, a análise de diversidade entre os grupos de fêmeas saudáveis (SD) e com descarga vulvar purulenta (DV), foi realizada separadamente para cada granja. Não houve diferenças entre esses grupos para os índices Chao1 e Shannon quanto à riqueza e diversidade da comunidade bacteriana. O diagrama de Venn também mostra que porcas DV e SD compartilham a maioria das OTU's (69%) (Fig. 14).

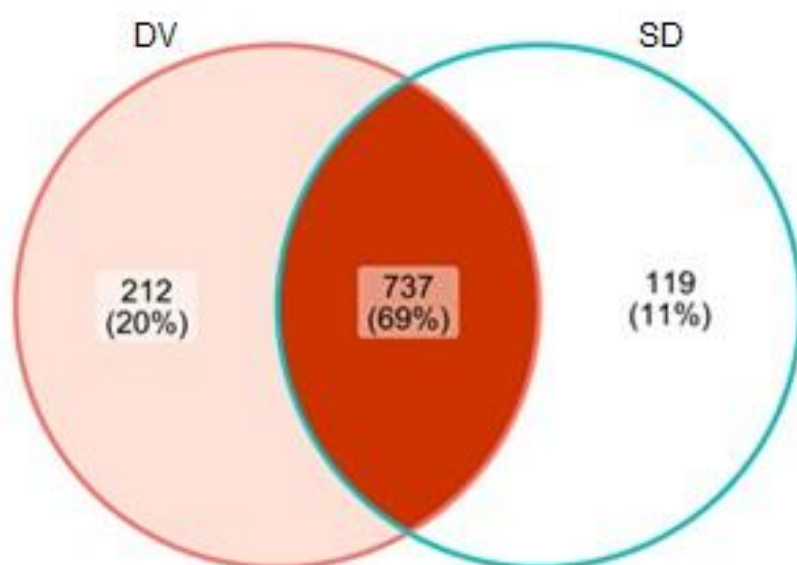


Figura 14: Diagrama de Venn para o conjunto de OTU's entre fêmeas com descarga vulvar purulenta (DV) e fêmeas saudáveis (SD).

Para a análise de diversidade beta, o PCoA baseado em análise Unweighted UniFrac mostrou que para as granjas G2 e G3 houve diferença entre porcas DV e SD ($p < 0,05$, $q < 0,05$, PERMANOVA). Para granja G4 houve tendência de diferença entre os grupos ($p = 0,064$, $q = 0,064$) (Figura 15).

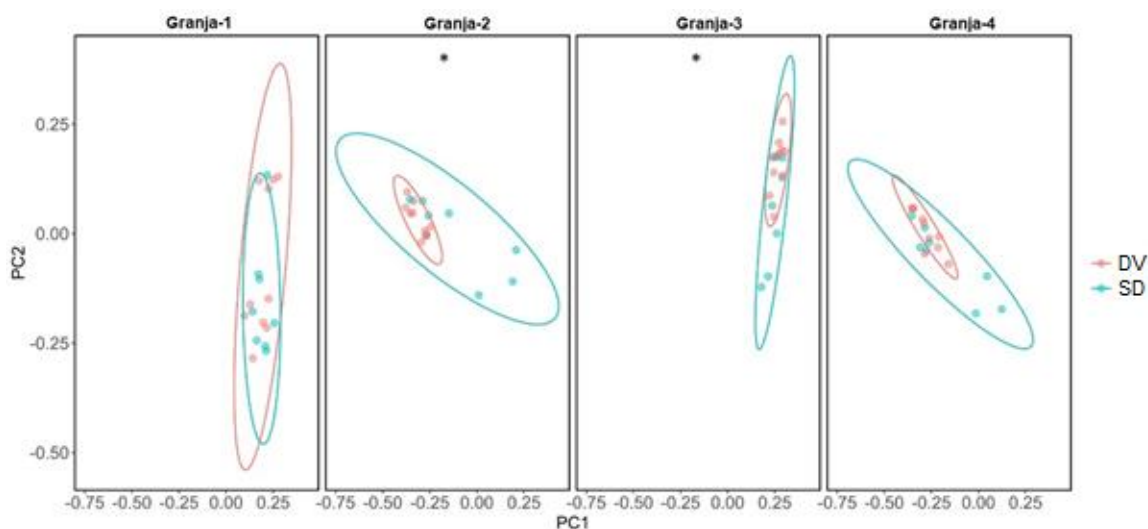


Figura 15: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) para o índice *Unweighted UniFrac*, mostrando os agrupamentos entre porcas com e sem descarga vulvar para cada granja. Vermelho: porcas com descarga vulvar purulenta (DV); Azul: porcas saudáveis (SD). *Indica diferença significativa entre DV e SD (PERMANOVA, $p < 0.05$; $q < 0.05$).

4.5.3 Composição taxonômica e análise de abundância diferencial

Analisando as granjas em conjunto ao nível do filo, *Proteobacteria* teve a maior abundância relativa em porcas dos grupos SD e DV, que representou 62,1% e 48,2% da abundância relativa, respectivamente, seguido por *Firmicutes*, que representou 29% e 34% da abundância relativa, respectivamente, e *Bacteroidota*, que representou 8,4% e 16,6% da abundância relativa, respectivamente (Fig. 16). Esses três filios representaram um “core” bacteriano para ambos os grupos, uma vez que os outros filios identificados representam menos de 1% da abundância relativa.

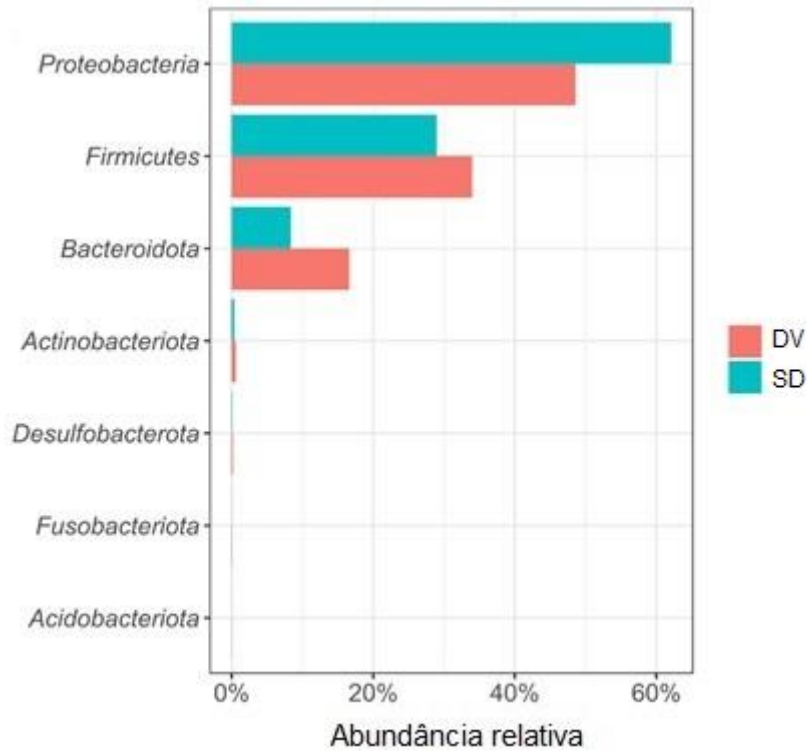


Figura 16: Abundância relativa para os principais filos na microbiota vaginal de porcas com e sem descarga vulvar purulenta.

Quando granjas foram analisadas separadamente, algumas diferenças na abundância relativa foram observadas (Fig. 17). Uma maior abundância de *Proteobacteria* foi observada para a granja G1 (SD: 72%, DV: 57%) e G2 (SD: 72,8%, DV: 62,1%) com uma menor abundância relativa de *Bacteroidota* (SD: 3%, DV: 4,77%; SD: 2,85%; DV: 3,44%). Em contraste, a granja G3 teve uma menor abundância relativa de *Proteobacteria* (SD: 26,5,6%, DV: 28,9%), mas uma maior abundância relativa de *Bacteroidota* (SD: 23,6%, DV: 38,2%). A granja G3 ainda apresentou maior abundância relativa de *Firmicutes* (SD: 49,5%, DV: 32,2%) em relação às demais granjas. A granja G4 teve elevada abundância relativa de *Proteobacteria* (SD: 71,3%, DV: 48%) e *Bacteroidota* (SD: 8,38%, DV: 28,6%), mas uma abundância relativa menor de *Firmicutes* em comparação com

as outras granjas (SD: 18,8 %, DV: 20,7%). Com exceção de G3, a abundância relativa de *Proteobacteria* foi maior nas fêmeas do grupo SD do que nas fêmeas do grupo DV em todas as granjas. Por outro lado, o filo *Bacteroidota* foi maior nas fêmeas DV em todos os rebanhos, principalmente em G3 e G4.

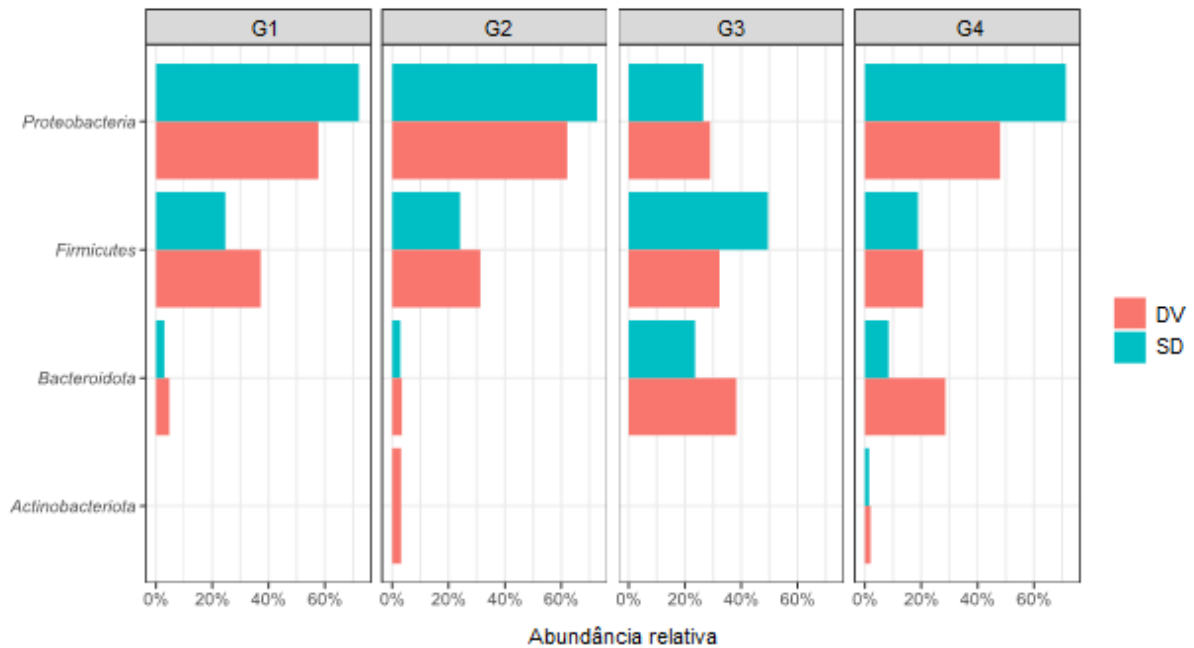


Figura 17: Abundância relativa para os principais filos na microbiota vaginal de porcas com e sem descarga vulvar purulenta em cada granja.

Ao nível do gênero (Figura 18), *Escherichia-Shigella* foi o mais abundante em ambos os grupos, mas com maior abundância em porcas saudáveis do que em porcas com descarga vulvar, representando 52,2% e 30,5% da abundância relativa quando os dados de todos as granjas foram analisados em conjunto. *Acinetobacter*, *Aerococcus*, *Prevotella* e *Pseudomonas* também mostraram uma abundância relativa ligeiramente maior em porcas saudáveis. Por outro lado, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Pasteurella*, *Porphyromonas* e *Staphylococcus* foram mais abundantes em porcas com secreção vulvar purulenta. Para *Pasteurella*, no entanto, todas as sequências vieram de uma única amostra no grupo DV.

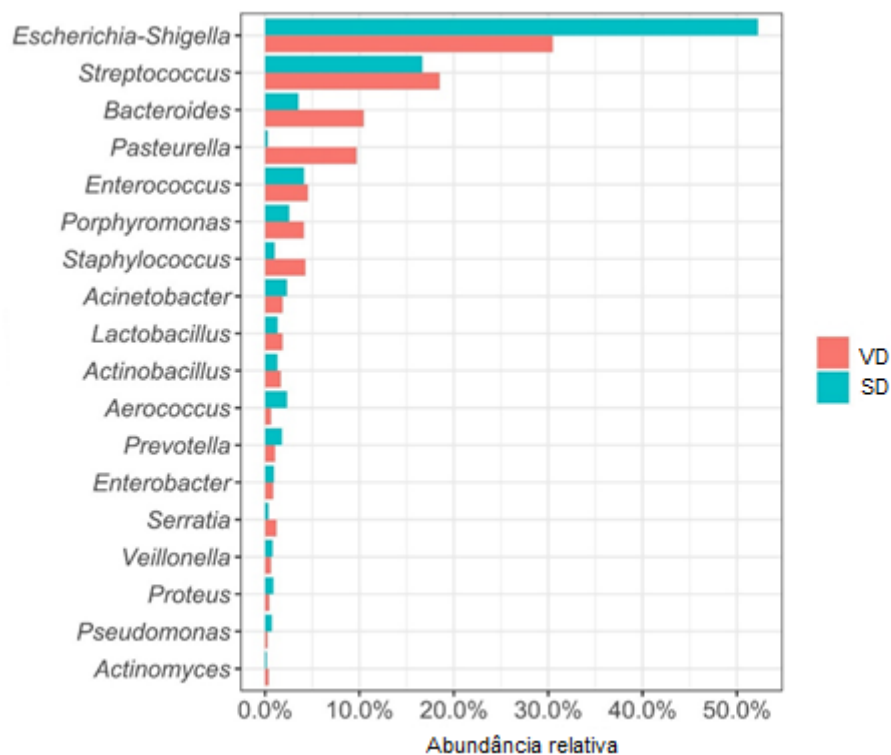


Figura 18: Abundância relativa para os principais gêneros na microbiota vaginal de porcas com e sem descarga vulvar purulenta.

O gráfico da Figura 19 mostra os gêneros com mais de 1% de abundância relativa para cada granja. *Escherichia-Shigella*, *Streptococcus* e *Bacteroides* continuam sendo os principais gêneros, presentes em todos os rebanhos. Mas diferenças notáveis podem ser observadas para *Porphyromonas* na granja G3, *Bacteroides* na granja G3 e G4, e *Staphylococcus* nas granjas G1 e G2.

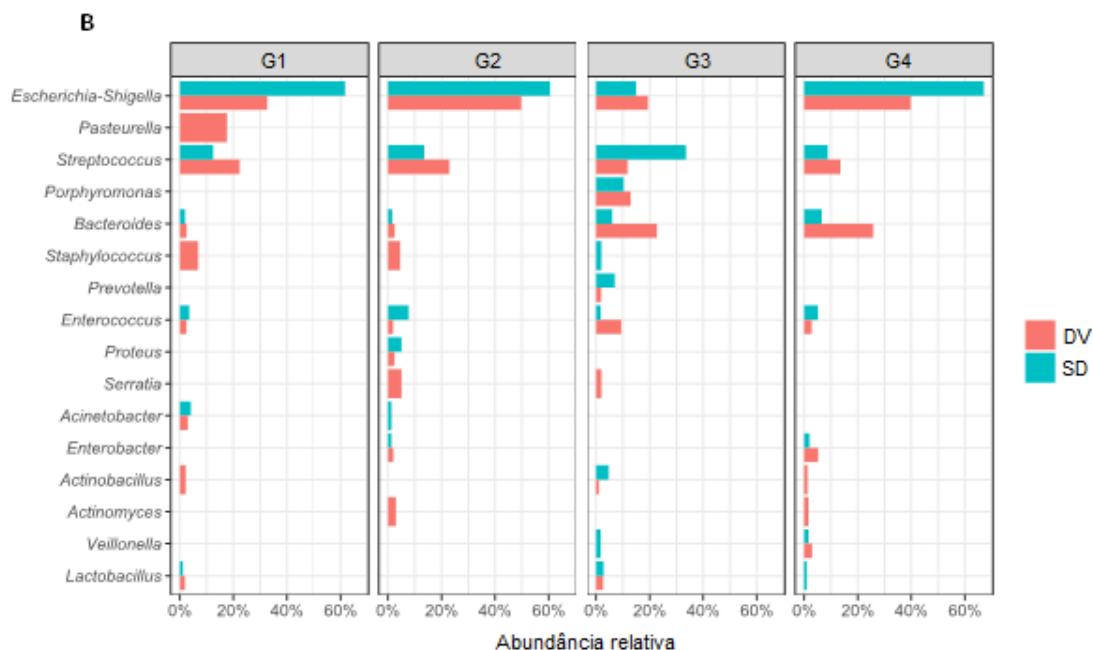


Figura 19: Abundância relativa para os principais gêneros na microbiota vaginal de porcas com e sem descarga vulvar purulenta em cada granja.

Como algumas OTUs puderam ser classificadas em nível de espécie, vale ressaltar que *Bacteroides pyogenes* e *Streptococcus dysgalactiae* foram encontrados em maior abundância relativa em fêmeas com descarga vulvar purulenta do que em fêmeas saudáveis (Figura 20).

A análise de abundância diferencial realizada pelo método ANCOM entre fêmeas DV e SD em todo o conjunto de dados revelou uma diferença significativa para a espécie *Bacteroides pyogenes*, com maior abundância relativa em fêmeas DV ($W = 44$). Quando o teste foi aplicado a cada granja separadamente, *Bacteroides pyogenes* foi significativamente mais abundante em fêmeas do grupo DV apenas na granja G3 ($W = 632$).

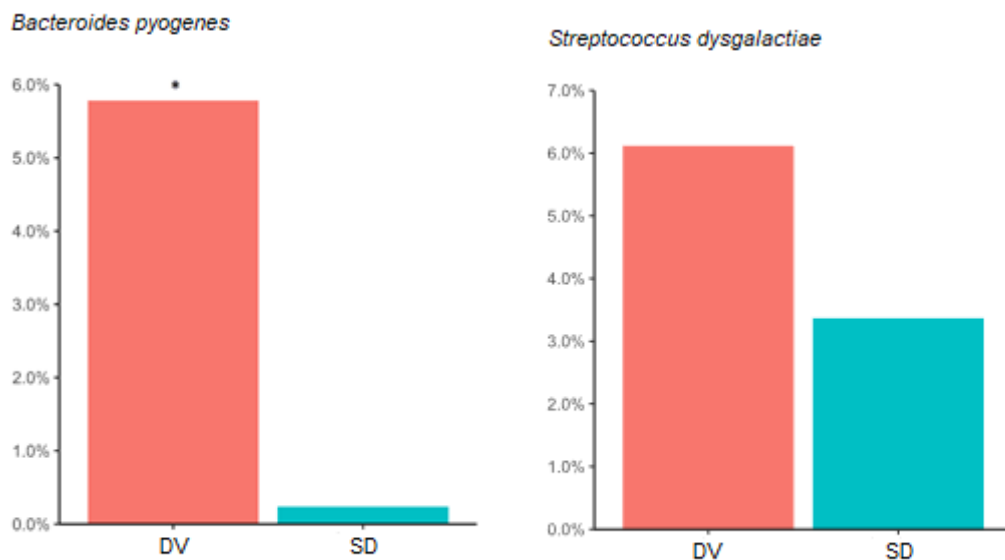
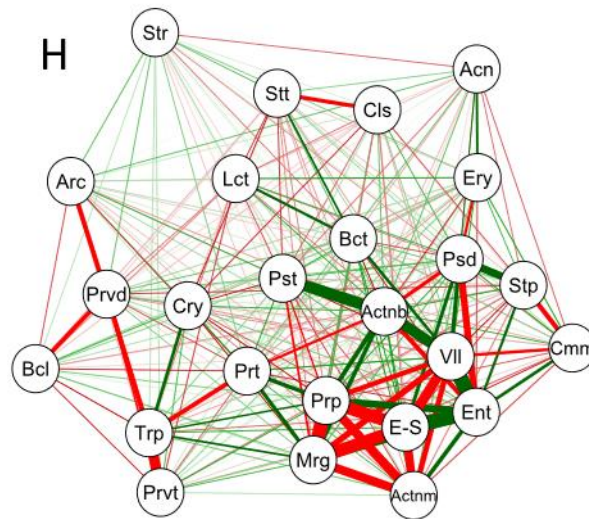
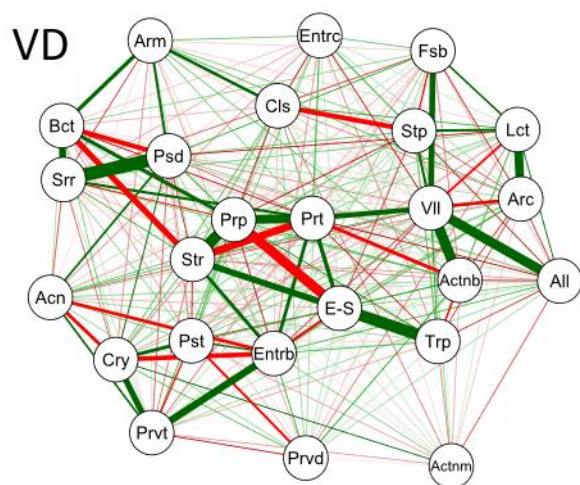


Figura 20: Abundância relativa entre porcas DV e SD para *Bacteroides pyogenes* e *Streptococcus dysgalactiae*. * Indica diferença significativa pelo método ANCOM ($W = 44$).

4.5.4 Análise de redes

A análise de redes mostra as correlações entre os gêneros bacterianos mais influentes nos grupos de porcas DV e SD (Figura 21). Para as porcas DV, as correlações positivas foram predominantes entre bactérias potencialmente patogênicas como *Escherichia-Shigella*, *Streptococcus*, *Trueperella*, *Corynebacterium* e *Prevotella*. Para porcas SD, no entanto, as correlações negativas foram predominantes com *Escherichia-Shigella* sendo um nó importante nessas correlações, mas com uma correlação positiva significativa com *Enterococcus faecalis*.



- | | |
|----------------------------------|----------------------------|
| Acn: <i>Acinetobacter</i> | Fsb: <i>Fusobacterium</i> |
| Actnb: <i>Actinobacillus</i> | Lct: <i>Lactobacillus</i> |
| Actnm: <i>Actinomyces</i> | Mrg: <i>Morganella</i> |
| All: <i>Alloprevotella</i> | Pst: <i>Pasteurella</i> |
| Arc: <i>Aerococcus</i> | Prp: <i>Porphyromonas</i> |
| Arm: <i>Aeromonas</i> | Prvt: <i>Prevotella</i> |
| Bcl: <i>Bacillus</i> | Prt: <i>Proteus</i> |
| Bct: <i>Bacteroides</i> | Prvd: <i>Providencia</i> |
| Cls: <i>Clostridium</i> | Psd: <i>Pseudomonas</i> |
| Cmm: <i>Comamonas</i> | Srr: <i>Serratia</i> |
| Cry: <i>Corynebacterium</i> | Stp: <i>Staphylococcus</i> |
| Entrb: <i>Enterobacter</i> | Str: <i>Streptococcus</i> |
| Entrc/Ent: <i>Enterococcus</i> | Stt: <i>Suterella</i> |
| Ery: <i>Erysipelaclostridium</i> | Trp: <i>Trueprella</i> |
| E-S: <i>Escherichia-Shigella</i> | VII: <i>Veillonella</i> |

Figura 21: Análise de rede para os principais agentes em porcas com descarga vulvar purulenta (DV) e saudáveis (SD). As linhas verdes indicam correlação positiva e vermelhas correlação negativa, respectivamente. A espessura da linha é proporcional à força da correlação de Pearson.

4.6 Discussão

Apesar dos grandes avanços genéticos que tornaram as fêmeas suínas hiperprolíficas, a mortalidade de matrizes tem aumentado em todo o mundo. As doenças reprodutivas são responsáveis por uma parte importante dessas mortes (CHINA SUPAKORN, 2019), sendo a descarga vulvar um dos principais sinais clínicos que apontam para problemas infecciosos no trato reprodutivo de porcas (KIRKWOOD et al., 2012). Poucos estudos avaliaram a composição bacteriana vaginal de porcas entre porcas saudáveis e porcas com infecção urogenital, e com um número limitado de animais (WANG et al., 2017; ZHANG et al., 2021). Para aumentar o conhecimento sobre a microbiota vaginal de porcas saudáveis e doentes e preencher a lacuna para esta avaliação em rebanhos brasileiros, avaliamos a hipótese de que pode haver algumas diferenças na microbiota vaginal de porcas com e sem descarga vulvar purulenta.

Nosso estudo mostrou que a microbiota vaginal dos animais diferiu entre as granjas. Isso pode ser devido a vários fatores não controlados, como diferenças nutricionais, ambientais e genéticas, nível de higiene das instalações e microclima. Embora existam algumas flutuações na abundância relativa ao nível de filo e gênero entre os rebanhos, o que explica a diferença no índice de beta-diversidade, eles compartilham a maioria dos agentes, com os filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidota* e os gêneros *Escherichia-Shigella*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Bacteroides* estando entre os mais relativamente abundantes em todas as granjas.

Para os grupos com e sem descarga vulvar purulenta, não houve diferença na riqueza e diversidade da comunidade bacteriana entre as porcas DV e SD. Mas a análise de beta-diversidade revelou uma diferença significativa entre

esses grupos pela análise de coordenadas principais do índice UniFrac para duas das quatro granjas, o que indica que a diferença entre as comunidades bacterianas pode ser devido a agentes específicos (LOZUPONE et al., 2007).

Proteobacteria, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram os filos predominantes para os grupos SD e DV. Resultados notavelmente comparáveis foram encontrados por outros estudos em animais saudáveis e doentes (WANG et al., 2017; KIEFER et al., 2021; TORRES LUQUE et al., 2021; XU et al., 2021; ZHANG et al., 2021), indicando que a microbiota vaginal das porcas é dominada por esses filos. A nível de gênero, houve elevada concordância com os resultados do método dependente de cultura, uma vez que *Escherichia*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* estão entre as maiores abundâncias relativas. Curiosamente, o filo *Bacteroidetes* e o gênero *Bacteroides* foram encontrados em alta abundância relativa apenas na abordagem metagenômica, em contraste com o método dependente de cultura. Isso pode ser devido à dificuldade dos métodos tradicionais de cultura em isolar bactérias fastidiosas, como membros do gênero de anaeróbios obrigatórios *Bacteroides* (MAJEWSKA; KIERZKOWSKA; KAWECKI, 2021). Isso reforça que a abordagem metagenômica pode ser mais eficaz na caracterização da microbiota devido à sua maior resolução para identificar agentes em baixa abundância ou fastidiosos, enquanto a abordagem dependente da cultura pode confirmar a viabilidade dos agentes detectados, tornando-as técnicas complementares.

Acinetobacter e *Pseudomonas* foram detectados com uma abundância relativa ligeiramente maior em porcas saudáveis. Ainda, a espécie *Acinetobacter Iwoffii* foi mais frequente em porcas SD no método de cultivo. Luque et al. (2021) também encontraram esses gêneros em amostras vaginais de porcas saudáveis.

Como apontam esses autores, apesar de não serem descritos como causadores de infecção urogenital em porcas, esses gêneros têm sido descritos como portadores e disseminadores de genes de resistência a antimicrobianos utilizados na prática veterinária e em medicina humana (LUPO; HAENNI; MADEC, 2018; GAO et al., 2020) e sua presença requer atenção.

Bacteroides, *Staphylococcus* e *Porphyromonas*, encontrados em maior abundância relativa em DV do que em porcas SD, também foram detectados em maior abundância relativa em porcas com endometrite em estudos recentes (WANG et al., 2017; ZHANG et al., 2021). Embora o sequenciamento não tenha diferenciado as espécies de *Staphylococcus*, nós sugerimos que parte dessa elevada abundância relativa em porcas DV possa ser representada por *Staphylococcus hyicus*, conforme demonstrado pela cultura e identificação por MALDI-TOF MS. *Streptococcus dysgalactiae*, com abundância relativa notavelmente maior também em porcas DV foi descrita como abundante em porcas com alto índice de prolapso de órgãos pélvicos, o que reforça a importância dessa espécie no trato genital (KIEFER et al., 2021).

Estudos anteriores mostraram que os métodos estatísticos comumente usados na análise de abundância diferencial, como ANOVA ou Kruskal-Wallis, não são apropriados para dados de composição, pois inflacionam as taxas de falsa descoberta (FDR) e, portanto, devem ser evitados (MANDAL et al., 2015; GLOOR et al., 2017). Estudos recentes mostraram que o teste ANCOM foi superior no controle da FDR, mantendo grande poder estatístico (MANDAL et al., 2015; LIN; PEDDADA, 2020). Em nosso estudo, esse teste revelou que a abundância relativa de *Bacteroides pyogenes* em porcas DV é maior do que em porcas SD, sendo um marcador de corrimento vulvar e sugerindo a sua

importância nas síndromes de corrimento vulvar, uma vez que este agente foi identificado em infecções uterinas em vacas e porcas (JEON et al., 2016; GALVÃO; BICALHO; JEON, 2019; ZHANG et al., 2021). De fato, Zhang et al. (2021) sugerem uma ligação entre o aumento de algumas bactérias na microbiota intestinal e casos de endometrite em porcas, incluindo o gênero *Bacteroides*. A patogenia das infecções por *Bacteroides pyogenes* ainda não é clara, principalmente na espécie suína, porém, um estudo recente descreveu esse agente em infecções importantes em humanos, como abscessos purulentos, feridas infectadas e infecções do trato urinário (MAJEWSKA; KIERZKOWSKA; KAWECKI, 2021). Apenas a granja G3 apresentou diferença significativa no método ANCOM para a maior abundância relativa de *B. pyogenes* nas fêmeas DV, o que poderia explicar a diferença na diversidade beta observada entre os grupos SD e DV para essa granja. Além disso, foi observado que a abundância relativa de *B. pyogenes* também foi maior em fêmeas do grupo DV quando as amostras de todos os rebanhos foram analisadas em conjunto. Ainda, os gráficos mostram que para todos os rebanhos a abundância relativa de *B. pyogenes* foi maior nas fêmeas do grupo DV. Embora essa diferença tenha sido mais notável para as granjas G3 e G4, essa é uma descoberta importante em todo o conjunto de dados.

As correlações da análise de rede entre os gêneros detectados pelo sequenciamento mostram que as porcas do grupo DV apresentaram mais correlações positivas entre agentes descritos como patogênicos para o trato reprodutivo, como *Escherichia-Shigella* e *Trueperella*, e *Escherichia-Shigella* e *Streptococcus* (DE WINTER et al., 1995; SENS; HEUWIESER, 2013; BRODZKI et al., 2014; CARNEIRO; CRONIN; SHELDON, 2016). Além disso, a associação

entre essas espécies também ocorreu no método dependente de cultura. A correlação positiva entre *Corynebacterium* e *Prevotella* também pode ser importante, pois esses agentes já foram descritos em distúrbios reprodutivos de porcas (POOR et al., 2017; KIEFER et al., 2021) e em humanos (SI et al., 2017). Tais correlações não ocorreram para fêmeas SD, nas quais *Escherichia-Shigella* e *Enterococcus* são nós dominantes, com correlações negativas, mostrando dominância desses agentes. Isso também é corroborado tanto pelos gráficos MALDI-TOF MS como pelos gráficos de abundância relativa do sequenciamento, uma vez que *Escherichia* e *Enterococcus* apresentam maior frequência e abundância relativa em fêmeas SD em todos os rebanhos. O gênero *Enterococcus* também apresentou forte correlação positiva com o gênero *Veillonella*, que é comumente encontrado em abundância considerável na microbiota vaginal de porcas saudáveis, entre 2% e 6% (SANGLARD et al., 2020a; KIEFER et al., 2021).

4.7 Conclusão

Este estudo fornece novas evidências sobre a composição bacteriana vaginal de porcas com e sem corrimento vulvar purulento. A maioria das bactérias obtidas em cultura também esteve presente no sequenciamento metagenômico, mostrando a viabilidade dos agentes detectados. A microbiota vaginal desses grupos compartilha a maioria das características identificadas pelo sequenciamento de 16S rRNA, mas mudanças pontuais na abundância de certos agentes diferenciaram fêmeas dos grupos DV e SD, especialmente *Bacteroides pyogenes*. Frequências ou abundâncias relativas elevadas de agentes específicos em porcas com DV, e a associação entre eles, também

requerem atenção. Evidências sugerem que a disbiose no canal vaginal de fêmeas suínas que apresentam corrimento vulvar purulento pode ocorrer pela associação e aumento de algumas bactérias potencialmente patogênicas como *Bacteroides pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus hyicus*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Trueperella pyogenes*.

5. Referências bibliográficas

ABPA. Relatório Anual. **Associação Brasileira de Proteína Animal**, p. 160, 2020. Disponível em: <<http://abpa-br.org/relatorios/>>.

ALSSAHEN, M. et al. Epidemiological analysis of *Trueperella abortus* isolated from cases of pig abortion of a single farm. **Folia Microbiologica**, v. 65, n. 3, p. 491–496, 29 jun. 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12223-019-00753-9>>.

ALTHOUSE, G. C.; KAUFFOLD, J.; ROSSOW, S. Diseases of the reproductive system. In: ZIMMERMAN, J. J. et al. (Ed.). **Diseases Of Swine**. 11. ed. [s.l.] Willey Blackwell, 2019.

AMIR, A. et al. Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns. **mSystems**, v. 2, n. 2, p. 1–7, 21 abr. 2017. Disponível em: <<http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2012-13-9-r79>>.

ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 215–237, jun. 2003. Disponível em: <[https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1016/S0168-6445(03)00055-X)>.

ATA, B. et al. The Endobiota Study: Comparison of Vaginal, Cervical and Gut Microbiota Between Women with Stage 3/4 Endometriosis and Healthy Controls. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

BARA, M. R. et al. A study of the microbial flora of the anterior vagina of normal sows during different stages of the reproductive cycle. **Australian veterinary journal**, v. 70, n. 7, p. 256–259, 1993. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L23926195>>.

BAUER, R. J. et al. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iroN* (*E. coli*). **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 10, p. 1521–4, 15 maio 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992291>>.

BERG, G. et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 103, 30 dez. 2020. Disponível em: <<https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-020-00875-0>>.

BIDET, P.; BONARCORSI, S.; BINGEN, E. Facteurs de pathogénicité et physiopathologie des *Escherichia coli* extra-intestinaux. **Archives de Pédiatrie**, v. 19, p. S80–S92, nov. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929693X12712794>>.

BIKSI, I. et al. Association between Endometritis and Urocystitis in Culled Sows. **Acta veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 4, p. 413–23, 2002. Disponível em: <http://apps.webofknowledge.com.ep.fjernadgang.kb.dk/full_record.do?product>

=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=9&SID=S1Cgd4dGUVzZePfQgTn&page=1&doc=1>.

BOKULICH, N. A. et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. **Nature Methods**, v. 10, n. 1, p. 57–59, 1 jan. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2276>>.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, 24 ago. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41587-019-0209-9>>.

BOOM, R. et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC269651/pdf/jcm00051-0103.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2017.

BRANDT, C. M.; SPELLERBERG, B. Human Infections Due to *Streptococcus dysgalactiae* Subspecies *equisimilis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 5, p. 766–772, set. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/605085>>.

BRODZKI, P. et al. *Trueperella pyogenes* and *Escherichia coli* as an etiological factor of endometritis in cows and the susceptibility of these bacteria to selected antibiotics. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 17, n. 4, p. 657–664, dez. 2014.

BUSCH, M. et al. Occurrence of chlamydiae in the genital tracts of sows at slaughter and their possible significance for reproductive failure. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 47, n. 6, p. 471–480, 2000.

CARNEIRO, L. C.; CRONIN, J. G.; SHELDON, I. M. Mechanisms linking bacterial infections of the bovine endometrium to disease and infertility. **Reproductive Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–7, mar. 2016.

CHINA SUPAKORN, C. S. A review of aetiology and risk factors affecting sow mortality. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 14, n. 026, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85071466014&doi=10.1079%2FPAVSNNR201914026&partnerID=40&md5=c31254614b9c5e6d15f29ee39865adc6>>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; 5th ed. **CLSI supplement VET01S**. ISBN 978-1-68440-093-5 CLSI Institute, USA, 2020.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26–38, 7 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro2265>>.

CUNHA, F. et al. Quantifying known and emerging uterine pathogens, and evaluating their association with metritis and fever in dairy cows. **Theriogenology**, v. 114, p. 25–33, jul. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X18300979>>.

DA SILVEIRA, P. R. S.; SCHEID, I. R.; ZANELLA, E. Saúde uterina e suas inter-relações com a eficiência reprodutiva da matriz suína. **Reprod Anim**, v. 31, n. 1, p. 54–59, 2007.

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

DE WINTER, P. J. J. et al. Bacterial Endometritis and Vaginal Discharge in the Sow: Prevalence of Different Bacterial Species and Experimental Reproduction of the Syndrome. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 3–4, p. 325–335, fev. 1995. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0029168636&doi=10.1016%2F0378-4320%2894%2901342-J&partnerID=40&md5=0175ba5312ebb252c87ca0282a557055>>.

DEE, S. A. Porcine urogenital disease. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 8, n. 3, p. 641–660, nov. 1992. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30709-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30709-X)>. Acesso em: 23 fev. 2017.

DER VARTANIAN, M. et al. Role of aerobactin in systemic spread of an opportunistic strain of *Escherichia coli* from the intestinal tract of gnotobiotic lambs. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 7, p. 2800–2807, 1992.

DIAL, G.; MACLACHION, N. Urogenital Infections of Swine Part I: Clinical Manifestations and Pathogenesis. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 10, n. 1, p. 63–70, 1988.

DING, Y. et al. Clonal analysis and virulent traits of pathogenic extraintestinal *Escherichia coli* isolates from swine in China. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em: <BMC Veterinary Research>.

DUTRA, M. C. et al. Antimicrobial Use in Brazilian Swine Herds: Assessment of Use and Reduction Examples. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 881, 20 abr. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/9/4/881>>.

EWERS, C. et al. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary microbiology**, v. 104, n. 1–2, p. 91–101, 30 nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530743>>.

EWERS, C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 297, n. 3, p. 163–76, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17374506>>.

FARNUM, D.; RIESE, R. Urogenital Infections in Sows and Gilts; Differential Diagnosis, Diagnostic Techniques and Control. **Iowa State University Veterinarian**, v. 51, n. 2, 1989. Disponível em: <http://lib.dr.iastate.edu/iowastate_veterinarian/vol51/iss2/15>.

FISCHBACH, M. A. et al. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 3, p. 132–138, 14 mar. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nchembio771>>.

FUNKE, G.; PÜNTER, V.; VON GRAEVENITZ, A. Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 12, p. 2874–2878, 1996.

GALVÃO, K. N.; BICALHO, R. C.; JEON, S. J. Symposium review: The uterine microbiome associated with the development of uterine disease in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 11786–11797, dez. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030219308689>>.

GAO, C.-H.; YU, G.; CAI, P. ggVennDiagram: An Intuitive, Easy-to-Use, and Highly Customizable R Package to Generate Venn Diagram. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 7 set. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.706907/full>>.

GAO, F.-Z. et al. Swine farming elevated the proliferation of Acinetobacter with the prevalence of antibiotic resistance genes in the groundwater. **Environment International**, v. 136, p. 105484, mar. 2020.

GERMON, P. et al. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 151, n. 4, p. 1179–1186, 1 abr. 2005. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.27809-0>>.

GLOCK, X. T. P.; BILKEI, G. The effect of postparturient urogenital diseases on the lifetime reproductive performance of sows. **Canadian Veterinary Journal**, v. 46, n. 12, p. 1103–1107, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16422062>>.

GLOOR, G. B. et al. Microbiome datasets are compositional: And this is not optional. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. NOV, p. 1–6, 2017.

GREEN, K. A.; ZAREK, S. M.; CATHERINO, W. H. Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract. **Fertility and Sterility**, v. 104, n. 6, p. 1351–1357, dez. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.10.010>>.

GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2847–2849, 15 set. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btw313>>.

HE, J. et al. Heat stress affects fecal microbial and metabolic alterations of primiparous sows during late gestation. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019.

HIJAZIN, M. et al. Identification of trueperella (*Arcanobacterium*) bernardiae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis and by species-specific PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 457–459, 2012.

HORNE, S. M. et al. Cloning and sequencing of the iss gene from a virulent avian *Escherichia coli*. **Avian diseases**, v. 44, n. 1, p. 179–84, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737659>>.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Metagenomics. **Nature**, v. 455, n. 7212, p. 481–483, 24 set. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0262407920308733>>.

ISLING, L. K. et al. Pyelonephritis in slaughter pigs and sows: Morphological characterization and aspects of pathogenesis and aetiology. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1, 2010.

JANBEN, T. Virulence-associated genes in avian pathogenic (*APEC*) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 5, p. 371–378, 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422104700466>>.

JAROSZ, S.; GRĄDZKI, Z.; KALINOWSKI, M. Trueperella pyogenes infections in swine: Clinical course and pathology. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 17, n. 2, p. 395–404, 2014.

JEON, S. J. et al. Uterine Microbiota and Immune Parameters Associated with Fever in Dairy Cows with Metritis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0165740, 1 nov. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0165740>>.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6–7, p. 383–404, out. 2005. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed7&AN=2005395705%5Cnhttp://sfxeu08.hosted.exlibrisgroup.com/sgul?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=doi:10.1016%2Fj.ijmm.2005.07.005&issn=1438-4221&isbn=&volume=295&issue=6-7&spage=383&pages>>.

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. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/315217>>.

JOHNSON, T. J.; JOHNSON, S. J.; NOLAN, L. K. Complete DNA Sequence of a ColBM Plasmid from Avian Pathogenic *Escherichia coli* Suggests that It Evolved from Closely Related ColV Virulence Plasmids. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 16, p. 5975–5983, 15 ago. 2006. Disponível em:

<<https://jb.asm.org/content/188/16/5975>>.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y. M.; NOLAN, L. K. Evolution of the *iss* Gene in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2360–2369, 15 abr. 2008. Disponível em: <<http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02634-07>>.

JORDAN; BISANZ. **qiime2R: Importing QIIME2 artifacts and associated data into R sessions**. Disponível em: <<https://github.com/jbisanz/qiime2R>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

JØRGENSEN, P. K. et al. First porcine abortion associated with *Trueperella abortus* in the United Kingdom. **Veterinary Record Case Reports**, v. 9, n. 4, 2021.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro818>>.

KIEFER, Z. E. et al. Vaginal microbiome and serum metabolite differences in late gestation commercial sows at risk for pelvic organ prolapse. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-85367-3>>.

KIRKWOOD, R. N. et al. Diseases of Reproductive System. In: ZIMMERMAN, J. J. et al. (Ed.). **Diseases Of Swine**. 10. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012. p. 329–347.

KRAG, L. et al. Genotypic and phenotypic characterisation of *Escherichia coli* strains associated with porcine pyelonephritis. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 3–4, p. 318–326, 2 mar. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113508003519>>.

LAMONT, R. et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 118, n. 5, p. 533–549, abr. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0528.2010.02840.x>>.

LAURECKIENE, Z. et al. Prevention of sow uterine inflammation. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 50, n. 4, p. 509–512, 2006.

LIN, H.; PEDDADA, S. Das. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17041-7>>.

LIU, H. et al. Maternal milk and fecal microbes guide the spatiotemporal development of mucosa-associated microbiota and barrier function in the porcine neonatal gut. **BMC Biology**, v. 17, n. 1, p. 106, 18 dez. 2019. Disponível em: <<https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-019-0729-2>>.

LOZUPONE, C. A. et al. Quantitative and Qualitative β Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities. **Applied**

and Environmental Microbiology, v. 73, n. 5, p. 1576–1585, mar. 2007. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01996-06>>.

LUPO, A.; HAENNI, M.; MADEC, J.-Y. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 3, jun. 2018. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.ARBA-0007-2017>>.

LUPPI, A. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. **Porcine Health Management**, v. 3, n. 1, p. 16, 8 dez. 2017. Disponível em: <<https://porcinehealthmanagement.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s40813-017-0063-4?site=porcinehealthmanagement.biomedcentral.com>>.

LUQUE, A. T. et al. Vaginal bacterial diversity from healthy gilts and pregnant sows subjected to natural mating or artificial insemination. **Research in Veterinary Science**, p. 143393, jul. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143393>>.

MAES, D.; VERDONCK, M.; KRUIF, A. DE. Vaginal microecology and vulvar discharge in swine. **Old Herborn University Seminar Monograph 12**, v. 50, p. 39–50, 1999.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, mar. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>>.

MAJEWSKA, A.; KIERZKOWSKA, M.; KAWECKI, D. What we actually know about the pathogenicity of *Bacteroides pyogenes*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 210, n. 2, p. 157–163, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00430-021-00709-2>>.

MALUTA, R. P. et al. Variants of ast A gene among extra-intestinal *Escherichia coli* of human and avian origin. **FEMS Microbiology Letters**, p. fnw285, 18 dez. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1093/femsle/fnw285>>.

MANDAL, S. et al. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 26, n. 0, 2015.

MARCUS, S. et al. A novel method for the diagnosis of bacterial contamination in the anterior vagina of sows based on measurement of biogenic amines by ion mobility spectrometry: A field trial. **Theriogenology**, v. 78, n. 4, p. 753–758, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.022>>.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10, 2 maio 2011. Disponível em: <<http://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200>>.

MAURER, J. J. et al. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian diseases**, v. 42, n. 1, p. 106–18, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9533087>>.

MELLAGI, A. P. G. et al. Caracterização e desempenho reprodutivo de fêmeas suínas submetidas à intervenção obstétrica manual. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1478–1484, ago. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000500027&lng=pt&tlng=pt>.

MEREDITH, M. J. Bacterial endometritis. In: **Current Therapy in Theriogenology**. 2nd. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 953–956.

MORENO, A. M. et al. Antimicrobial Resistance Profile of *Staphylococcus hyicus* Strains Isolated from Brazilian Swine Herds. p. 1–12, 2022.

MORENO, L. Z. et al. Molecular and antimicrobial susceptibility profiling of *Streptococcus dysgalactiae* isolated from swine. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 2, p. 178–180, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.020>>.

MORENO, L. Z. et al. Characterization of Porcine *Trueperella Pyogenes* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), Molecular Typing and Antimicrobial Susceptibility Profiling in Sao Paulo State. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 51, p. 49–53, abr. 2017.

MORENO, L. Z. et al. Identification through MALDI-TOF mass spectrometry and antimicrobial susceptibility profiling of bacterial pathogens isolated from sow urinary tract infection. **Veterinary Quarterly**, v. 38, n. 1, p. 1–8, 2018.

MUIRHEAD, M. R. Constraints on productivity in the pig herd. **Veterinary Record**, v. 102, n. 11, p. 228 LP – 231, 18 mar. 1978. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/102/11/228.abstract>>.

NATHUES, H. et al. Infectious agent detection in reproductive disorders in swine herds. Retrospective evaluation of diagnostic laboratory examinations. **Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere**, v. 39, n. 3, p. 155–161, 2011. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L560075781>>.

NOLAN, L. K. et al. Resistance to serum complement, iss, and virulence of avian *Escherichia coli*. **Veterinary research communications**, v. 27, n. 2, p. 101–10, fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12718504>>.

OAKLEY, B. B. et al. Diversity of Human Vaginal Bacterial Communities and Associations with Clinically Defined Bacterial Vaginosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4898–4909, ago. 2008. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02884-07>>.

OELSCHLAEGER, T. A. Adhesins as invasins. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 291, n. 1, p. 7–14, abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11403413>>.

ORAVAINEN, J. et al. Vulvar Discharge Syndrome in Loosely Housed Finnish Pigs: Prevalence and Evaluation of Vaginoscopy, Bacteriology and Cytology. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 43, n. 1, p. 42–47, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L351108750>>.

PASCOTTINI, O. B. et al. Dynamics of uterine microbiota in postpartum dairy cows with clinical or subclinical endometritis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-69317-z>>.

PEREIRA, G. A. et al. Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 507–510, 2008.

PÉREZ-SANCHO, M. et al. Usefulness of MALDI-TOF MS as a diagnostic tool for the identification of *Streptococcus* species recovered from clinical specimens of pigs. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2017.

PETERSEN, A.; SKOV, R. L.; LARSEN, A. R. Resistance in human clinical bacteria. **Danmap**, p. 89–92, 2013. Disponível em: <http://www.danmap.org/~media/Projekt_sites/Danmap/DANMAP_reports/DANMAP_2013/DANMAP_2013.ashx>.

PITOUT, J. D. D. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00009/abstract>>.

POOLMAN, J. T.; WACKER, M. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, a common human pathogen: challenges for vaccine development and progress in the field. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 1, p. 6–13, 2016.

POOR, A. P. et al. Characterization of *Corynebacterium Diphtheriae*, *C. Confusum* and *C. Amycolatum* Isolated from Sows with Genitourinary Infection. **Veterinary Microbiology**, v. 207, n. April, p. 149–152, ago. 2017. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L616887469>>.

PROHASKA, S. et al. MALDI-TOF MS for identification of porcine *Brachyspira* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 292–298, 2014.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 27 nov. 2012. Disponível em: <<http://academic.oup.com/nar/article/41/D1/D590/1069277/The-SILVA-ribosomal-RNA-gene-database-project>>.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

REUTER, J. A.; SPACEK, D. V.; SNYDER, M. P. High-Throughput Sequencing Technologies. **Molecular Cell**, v. 58, n. 4, p. 586–597, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>>.

ROGNES, T. et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, p. e2584, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27781170>>.

ROTH, J. A.; KAEBERLE, M. L.; HSU, W. H. Effect of estradiol and progesterone on lymphocyte and neutrophil functions in steers. **Infection and immunity**, v. 35, n. 3, p. 997–1002, mar. 1982. Disponível em: <<http://www.eje-online.org/cgi/doi/10.1530/acta.0.1270185>>.

SANGLARD, L. P. et al. Investigating the relationship between vaginal microbiota and host genetics and their impact on immune response and farrowing traits in commercial gilts. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 137, n. 1, p. 84–102, 25 jan. 2020a. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jbg.12456>>.

SANGLARD, L. P. et al. Vaginal microbiota diverges in sows with low and high reproductive performance after porcine reproductive and respiratory syndrome vaccination. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3046, 20 dez. 2020b. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-020-59955-8>>.

SCHEIFER, C. et al. Re-emergence of *Corynebacterium diphtheriae*. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 49, n. 6, p. 463–466, set. 2019.

SCHILLER, J.; GROMAN, N.; COYLE, M. Plasmids in *Corynebacterium diphtheriae* and diphtheroids mediating erythromycin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 18, n. 5, p. 814–821, nov. 1980. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.18.5.814>>.

SCHUBERT, S. et al. Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infection and immunity**, v. 66, n. 2, p. 480–5, fev. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9453599>>.

SCHWARZ, S. et al. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 601–604, 24 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350900604X>>.

SCOFIELD, A. M.; CLEGG, F. G.; LAMMING, G. E. EMBRYONIC MORTALITY AND UTERINE INFECTION IN THE PIG. **Reproduction**, v. 36, n. 2, p. 353–361, 1 fev. 1974. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4594617>.

SENS, A.; HEUWIESER, W. Presence of *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, α -hemolytic streptococci, and coagulase-negative staphylococci and prevalence of subclinical endometritis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6347–6354, out. 2013.

SI, J. et al. *Prevotella* as a Hub for Vaginal Microbiota under the Influence of Host Genetics and Their Association with Obesity. **Cell Host & Microbe**, v. 21, n. 1, p. 97–105, jan. 2017.

SIRLICI, M. P.; TRABULSI, L. R. Fatores de virulência: adesão, invasão, sideróforos, evasinas. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4. ed. [s.l.] Atheneu, 2005. p. 143–156.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 134–163, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2007.0087>>.

SONG, D. et al. Altered Gut Microbiota Profiles in Sows and Neonatal Piglets Associated with Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17439, 12 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-17830-z>>.

SPINDOLA, M. G. et al. Genetic diversity, virulence genotype and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from sows. **Veterinary Quarterly**, v. 38, n. 1, p. 79–87, 1 jan. 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01652176.2018.1519321>>.

TAN, C. et al. Serotypes and virulence genes of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates from diseased pigs in China. **Veterinary Journal**, v. 192, n. 3, p. 483–488, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.06.038>>.

TIVENDALE, K. A. et al. Association of *iss* and *iucA*, but Not *tsh*, with Plasmid-Mediated Virulence of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6554–6560, 1 nov. 2004. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.72.11.6554-6560.2004>>.

TORRES LUQUE, A. et al. Vaginal bacterial diversity from healthy gilts and pregnant sows subjected to natural mating or artificial insemination. **Research in Veterinary Science**, v. 140, p. 26–37, nov. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528821002381>>.

TSUKAMOTO, T. PCR method for detection of K1 antigen and serotypes of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infection. **Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases**, v. 71, n. 2, p. 125–9, fev. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9077069>>.

ÜLBEGI-MOHYLA, H. et al. Characterization of *Arcanobacterium abortus* by phenotypic properties and by sequencing the 16S–23S rDNA intergenic spacer region. **Veterinary Microbiology**, v. 148, n. 2–4, p. 431–433, 24 mar. 2011.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037811351000413X>>.

WALLER, C. M.; BILKEI, G.; CAMERON, R. D. A. Effect of periparturient diseases accompanied by excessive vulval discharge and weaning to mating interval on sow reproductive performance. **Australian Veterinary Journal**, v. 80, n. 9, p. 545–549, 2002. Disponível em: <http://apps.webofknowledge.com.ep.fjernadgang.kb.dk/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=13&SID=S2sBrYQrJPYFuiTjMqg&page=1&doc=1>.

WANG, J. et al. Characterization of Vaginal Microbiota of Endometritis and Healthy Sows Using High-Throughput Pyrosequencing of 16S rRNA Gene. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 325–330, out. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401017305144>>.

WANG, S. et al. Effects of *ibeA* Deletion on Virulence and Biofilm Formation of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 1, p. 279–287, jan. 2011. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00821-10>>.

WANYOIKE, S. K.; BILKEI, C. Concurrent pathological and bacteriological findings in the urogenital organs and mammary glands of sows culled because of chronic vulvovaginal discharge and swine urogenital disease (SUGD): a case study. **Tijdschrift voor diergeneeskunde**, v. 131, n. 19, p. 686–91, 1 out. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17052075>>. Acesso em: 27 mar. 2017.

WEGENER, H. C. et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 793–795, 1994.

WENTZ, I. et al. AS INFECÇÕES UTERINAS COMO CAUSA DE REPETIÇÃO DE COBRIZAÇÃO EM PORCAS. **Comunicado Técnico Embrapa - CT / 112 / EMBRAPA–CNPQA**, p. 1–3, 1986.

WHITE, B. A. et al. The vaginal microbiome in health and disease. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 10, p. 389–393, out. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2011.06.001>>.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) - Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**. 6. ed. [s.l.] WHO, 2018.

WICKHAM, H. **ggplot2**. New York, NY: Springer New York, 2009.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 85, n. 1, p. 11–19, 2008.

WINTER, P. J. J. et al. Influence of the Oestrous Cycle on Experimental Intrauterine *E. coli* Infection in the Sow. **Journal of Veterinary Medicine Series**

A, v. 41, n. 1–10, p. 640–644, 12 fev. 1994. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0442.1994.tb00131.x>>.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, 1977.

XU, S. et al. Responses of vaginal microbiota to dietary supplementation with lysozyme and its relationship with rectal microbiota and sow performance from late gestation to early lactation. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 1–16, 2021.

YAMAMOTO, S. et al. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 85–90, out. 1995. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00179.x>>.

YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infection and immunity**, v. 64, n. 4, p. 1441–5, abr. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8606115>>.

ZASADA, A. A.; BACZEWSKA-REJ, M.; WARDAK, S. An increase in non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in Poland - molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreaks and those currently circulating in Poland. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 10, p. e907–e912, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2010.05.013>>.

ZHANG, L. et al. Effect of Sow Intestinal Flora on the Formation of Endometritis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. June, p. 1–8, 2021.

ZHULIN, I. B. Classic Spotlight: 16S rRNA Redefines Microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 20, p. 2764–2765, 15 out. 2016. Disponível em: <<https://jb.asm.org/content/198/20/2764>>.