



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ROBSON DIEGO SILVA GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE *Escherichia coli* ISOLADA
DE UM SURTO DE DIARREIA EM BEZERROS.**

Presidente Prudente - SP
2019

ROBSON DIEGO SILVA GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE *Escherichia coli* ISOLADA
DE SURTO DE DIARREIA EM BEZERROS**

Qualificação de Mestrado apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Coorientadora: Profa. Dra. Rogéria Keller
Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

636.089
G635c Gonçalves, Robson Diego Silva.
 Caracterização molecular e fenotípica de
 Escherichia coli isolada de surto de diarreia em bezerros
 / Robson Diego Silva Gonçalves. – Presidente Prudente,
 2019.
 35 f.: il.

 Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Saúde
 Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
 Presidente Prudente, SP, 2019.
 Bibliografia.
 Orientador: Hermann Bremer Neto.

 1. CIEC. 2. Enteropatógeno. 3. FdeC. 4.
 Sequenciamento Gênico. 5. Invasão. I. Título.

ROBSON DIEGO SILVA GONÇALVES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE *Escherichia coli* ISOLADA
DE SURTO DE DIARRÉIA EM BEZERROS.**

Dissertação de Mestrado apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 28 de Outubro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hermann Bremer Neto
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Josias Rodrigues
Universidade Estadual Paulista – Unesp
Botucatu-SP

Prof. Dr. Edson Mareco Assunção
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, guia e socorro presente na hora da angústia, a minha mãe Sandra e ao meu padrasto José Leandro que sempre estiveram ao meu lado, não me deixando desistir.

Dedico também a todos aqueles que fizeram do meu sonho realidade, estando presentes em minha trajetória acadêmica me proporcionando forças para que eu não desistir de ir atrás do que eu buscava para a minha vida.

Muitos obstáculos foram impostos para mim durante esses últimos anos, mas graças a vocês eu não fraquejei.

AGRADECIMENTOS

A Deus, quando algumas vezes, sentindo-me desacreditado e perdido nos meus objetivos, ideais ou minha pessoa, me fez vivenciar a delia de me formar.

A minha querida mãe Sandra e meu padrasto José Leandro, que me trouxeram com todo o amor e carinho a este sonho, dedicaram, cuidaram e doaram incondicionalmente seu sangue e suor em forma de amor e trabalho por mim, despertando e alimentando em minha personalidade, ainda na infância, a sede pelo conhecimento e a importância deste em minha vida.

Ao meu companheiro Anderson e aos meus amigos que sempre elevaram minha autoestima e principalmente por acreditarem e reascenderem em mim, o interesse pelo antigo sonho de me formar na área de Microbiologia.

Aos amigos(as), familiares, funcionários(as), professores(as) e todos aqueles(as) que cruzaram em minha vida, participando de alguma forma na construção e realização deste tão desejado sonho.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante o período de pesquisa, em especial ao Prof. Dr. Hermann Bremer Neto meu Orientador e à Prof.^a Dra. Rogéria Keller Co orientadora, que com paciência ajudou na realização deste trabalho e foram responsáveis por sua conclusão.

“Se quiser triunfar na vida,
faça da perseverança a sua melhor amiga;
da experiência, o seu conselheiro;
da prudência, o seu irmão mais velho;
e da esperança, o seu anjo da guarda.

Joseph Addison

RESUMO

Caracterização molecular e fenotípica de *Escherichia coli* isolada de surto de diarreia em bezerros

Escherichia coli é uma das principais causas de diarreia em bezerros neonatos e a intensificação da bovinocultura tem aumentado a sua incidência. O objetivo do estudo é caracterização molecular e fenotípica da amostra de *E. coli* isolada de um surto de diarreia em bezerros neonatos na Região Oeste de São Paulo, Brasil, no ano de 2016. As amostras de *E. coli* foram analisadas por PCR para a presença dos seguintes genes de virulência: *cnf1*, *cnf2*, *lt1*, *lt2*, *sta*, *stx1*, *stx2*, F5(k99), F41. Testes em cultura de células HeLa foram realizados e observou-se grande poder invasor nessas amostras. Testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas revelaram resistência a múltiplas drogas. Pela análise do sequenciamento gênico detectou-se que a amostra em questão apresenta o gene *fdeC* e ausência dos demais genes característicos das categorias de *E. coli* já descritas. No anatomopatológico observou-se septicemia, com congestão passiva do fígado e do rim com necrose multifocal dos hepatócitos e inflamação da alça intestinal. Esses dados indicam que se trata de uma nova categoria de *E. coli* aqui denominada “calf invasive *E. coli*” - CIEC. De acordo com a literatura o papel do gene *fdeC* está relacionado com a capacidade invasora de amostras de *E. coli* patogênicas enquanto que a proteína FdeC vem sendo descrita como forte candidato para ser utilizada como antígeno para a construção de uma vacina de amplo espectro contra *E. coli* de origem intestinal e extra intestinal.

Palavras-chave: CIEC, enteropatógeno, FdeC, sequenciamento gênico, invasão.

ABSTRACT

Molecular and phenotypical characterization of *Escherichia coli* isolated from diarrhea in calves

Escherichia coli is a major cause of diarrhea in newborn calves and the intensification of cattle raising has increased its incidence. The objective of this study is to characterize the molecular and phenotypic characterization of the *E. coli* sample isolated from a diarrhea outbreak in neonatal calves in the western region of São Paulo, Brazil, in 2016. The *E. coli* samples were analyzed by PCR for presence of the following virulence genes: *cnf1*, *cnf2*, *lt1*, *lt2*, *sta*, *stx1*, *stx2*, F5 (k99), F41. HeLa cell culture tests were performed and great invasive power was observed in these samples. Antimicrobial drug susceptibility testing revealed resistance to multiple drugs. The analysis of gene sequencing revealed that the sample in question presents the *fdeC* gene and absence of the other characteristic genes of the *E. coli* categories already described. Pathological examination revealed septicemia, with passive congestion of the liver and kidney with multifocal hepatocyte necrosis and inflammation of the intestinal loop. These data indicate that this is a new category of *E. coli* here called “calf invasive *E. coli*” - CIEC. According to the literature, the role of the *fdeC* gene is related to the invasive capacity of pathogenic *E. coli* samples, while the FdeC protein has been described as a strong candidate for use as an antigen for the construction of a broad-spectrum *E. coli* of intestinal and extra - intestinal origin.

Keywords: CIEC, enteropathogen, FdeC, gene sequencing, invasion.

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	10
	ANEXO A – PARECER FINAL.....	25
	ANEXO B – ESTRUTURA DO ARTIGO.....	26

Artigo a ser submetido a Revista: The Journal of Infection

Molecular and phenotypical characterization of *Escherichia coli* isolated from diarrhea in calves

Caracterização molecular e fenotípica de *Escherichia coli* isolada de surto de diarreia em bezerros

Robson Diego Silva Gonçalves ¹; Yara Felipe Bueno Crosciolli ²; Gabriela Sumico Afonso Hanamoto ³; Eloisa Nascimento Jorge ⁴; Rosa Maria Silva ⁵; Josias Rodrigues ⁶; Edson Assunção Mareco ⁷; Rogéria Keller ⁷; Hermann Bremer Neto ⁷.

1 Discente do Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil. E mail: robsondiegobio@gmail.com

2 Discente do Curso da Faculdade de Biomedicina, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP Brasil. E-mail: yarafelippe@hotmail.com

3 Discente do Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil E mail: gabi.hanamoto@gmail.com

4 Discente do Curso da Faculdade de Medicina, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP,

5-Docente do Departamento de Microbiologia, do Curso de Microbiologia, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP. E mail: rosa.unifesp@gmail.com

6 Docente Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências (Campus de Botucatu) São Paulo, SP. E mail: josias.rodrigues@unesp.br

7 Departamento de Ciências Funcionais, Microbiologia e Meio Ambiente, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, Brasil E-mail: hermann@unoeste.br; rogeriakeller@unoeste.br; edson@unoeste.br

Resumo

Escherichia coli é uma das principais causas de diarreia em bezerros neonatos e a intensificação da bovinocultura tem aumentado a sua incidência. O objetivo do estudo é caracterização molecular e fenotípica da amostra de *E. coli* isolada de um surto de diarreia em bezerros neonatos na Região Oeste de São Paulo, Brasil, no ano de 2016. As amostras de *E. coli* foram analisadas por PCR para a presença dos seguintes genes de virulência: *cnf1*, *cnf2*, *lt1*, *lt2*, *sta*, *stx1*, *stx2*, F5(k99), F41. Testes em cultura de células HeLa foram realizados e observou-se grande poder invasor nessas amostras. Testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas revelaram resistência a múltiplas drogas. Pela análise do sequenciamento gênico detectou-se que a amostra em questão apresenta o gene *fdeC* e ausência dos demais genes característicos das categorias de *E. coli* já descritas. No anatomopatológico observou-se septicemia, com congestão passiva do fígado e do rim com necrose multifocal dos hepatócitos e inflamação da alça intestinal. Esses dados indicam que se trata de uma nova categoria de *E. coli* aqui denominada “calf invasive *E. coli*” - CIEC. De acordo com a literatura o papel do gene *fdeC* está relacionado com a capacidade invasora de amostras de *E. coli* patogênicas enquanto que a proteína FdeC vem sendo descrita como forte candidato para ser utilizada como antígeno para a construção de uma vacina de amplo espectro contra *E. coli* de origem intestinal e extra intestinal.

Palavras-chave: CIEC, enteropatógeno, FdeC, sequenciamento gênico, invasão.

Abstract

Escherichia coli is a major cause of diarrhea in newborn calves and the intensification of cattle raising has increased its incidence. The objective of this study is to characterize the molecular and phenotypic characterization of the *E. coli* sample isolated from a diarrhea outbreak in neonatal calves in the western region of São Paulo, Brazil, in 2016. The *E. coli* samples were analyzed by PCR for presence of the following virulence genes: *cnf1*, *cnf2*, *lt1*, *lt2*, *sta*, *stx1*, *stx2*, F5 (k99), F41. HeLa cell culture tests were performed and great invasive power was observed in these samples. Antimicrobial drug susceptibility testing revealed resistance to multiple drugs. The analysis of gene sequencing revealed that the sample in question does not belong to any category of *E. coli* known to have no virulence genes characteristic of the other categories. Pathological examination revealed septicemia, with passive liver and kidney congestion with multifocal hepatocyte necrosis and inflammation of the intestinal loop. These data indicate that this is a new category of *E. coli* here called “calf invasive *E. coli*” - CIEC. In addition to the proven role of *fdeC* in the pathogenesis of *E. coli* samples, FdeC adhesin is also a strong candidate for use as an antigen for the construction of a broad-spectrum *E. coli* vaccine of intestinal and extra-intestinal origin.

Key words: CIEC, enteropathogen, FdeC, gene sequencing, invasion

INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial e apresenta o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de animais (DUARTE, 2015). A intensificação da produção de bovinos nas últimas décadas, com unidades de produção mais adensadas, maiores e alcançando elevadas taxas de desempenho, porém necessitou do maior uso de antibióticos e provocou o aumento dos casos de contaminação por agentes patogênicos em bezerros neonatos, sendo a diarreia a causa maior de morbidade e mortalidade. Além disso, as doenças que ocorrem no início da vida dos bezerros podem interferir no desenvolvimento e produtividade desses animais quando adultos, acarretando o atraso na idade de abate e comprometem a rentabilidade comercial das propriedades rurais (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; EL-SEEDY et al., 2016).

A *Escherichia coli* se destaca como um importante enteropatógeno e cepas patogênicas desse microrganismo são classificadas em grupos ou patotipos, de acordo com a produção de fatores de virulência e mecanismos pelos quais causam doença. Já foram identificados cinco patotipos de *E. coli* associados à diarreia em bezerros: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC) (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014).

E. coli necrotoxigênica NTEC são caracterizadas pela produção de toxinas e a existência de dois tipos de CNF, tipo 1 e tipo 2 (CNF1 e CNF2) e foram isoladas de bezerros, leitões e crianças com enterite (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014).. É comum encontrar outros fatores de virulência em conjunto com CNF tais como hemolisina, fimbrias P, fimbrias S, F17 e no caso de CNF2, este pode vir associado a F17. Outro fator de virulência presente em NTEC, e também em isolados de ETEC, de STEC e de *E. coli* que causam infecções extra intestinais, é a alfa hemolisina, porém seu papel na patogênese da diarreia ainda é incerto. (SALVADORI, M ; VALADARES, M; LEITE, D; BLANCO, J; YANO, 2003).

A *E. coli* enteropatogênica (EPEC) pertence a um grupo de bactérias conhecidas coletivamente como patógenos aderentes (A / E), com base em sua capacidade de formar lesões distintas nas superfícies das células epiteliais intestinais. Enterohemorrágica *E. coli* (EHEC) é um subconjunto de STEC e foi originalmente descrito por sua associação com colite hemorrágica, que foi clinicamente distintas de shiguela, e tinha genotípicas características fenotípicas e que diferem dos de EPEC, O sorogrupo EHEC mais comum é o O157: H7 e tem sido objeto de muitos estudos, especialmente para mecanismos moleculares de patogênese.(CROXEN et al., 2013)

O objetivo desse estudo foi realizar a caracterização Molecular e Fenotípica da amostra de *E. coli* isolada de um surto de diarreia em bezerro para a procura de genes de virulência que possam ser futuramente utilizados na produção de vacinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Recebimento das amostras

Uma amostra de *E. coli* produtora do surto de diarreia em bezerros no ano de 2016 foram obtidas de Laboratório de Patologia Animal da região Oeste Paulista, SP.

Isolamento e Confirmação das amostras

As amostras foram isoladas em Ágar MacConkey em 24 horas a 37°C e utilizadas para confirmação dos testes bioquímicos: “Citrato, TSI, SIM, FENIL e LISINA”.

Armazenamento das amostras de E. coli

As amostras foram mantidas em estoque a temperatura ambiente, a -20° C e a -80° C.

Determinação do antígeno O

Para a determinação dos sorogrupos O de EPEC foram utilizados os soros (Probac do Brasil, São Paulo/Brasil) polivalentes anti *E. coli* enteropatogenica clássica: Polivalente A: Anti O26, O55, O55, O111, O119; Polivalente B : Anti O112ac, O124, O143, O164, O167 e poli C: Anti O86, O126, O127, O128 e seus respectivos monovalente. Para a determinação dos sorogrupos de EIEC foram utilizados os soros polivalentes *E. coli* enteroinvasora poli A: Anti O28ac, O29, O136, O144, O152 e poli B: Ant O112ac, O 124, O143, O164, O167 e soro anti-O157.

As amostras foram semeadas e crescidas em ágar MacConkey durante 24h a 37°C e uma colônia isolada foi testada para cada antisoro através do método de soro-aglutinação em lâmina.

Obtenção do Lisado Bacteriano

As amostras foram crescidas em TSA a 37° C por 24H. O crescimento foi suspenso em 500 uL de água deionizada estéril, homogeneizado, fervido por 10 minutos em BM a 100°C e mantido em gelo por 10 min. As amostras foram estocadas a -20°C até o momento de uso.

Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada com os primers especificados na Tabela 1.

A reação de PCR foi realizada com a utilização da MIX Go TaqGreen da (PROMEGA-USA), após a diluição dos primers a 100µM. A seguir, utilizou-se um volume final de reação de 25 uL. A amostra de *E. coli* C600 foi utilizada como controle negativo nas reações de PCR. O fragmento amplificado foi visualizado em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de etídio 10mg/mL. O padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, Brasil) foi utilizado em cada corrida.

Antibiograma

As amostras foram testadas para o padrão de resistência a antimicrobianos, através do Protocolo de Teste de Susceptibilidade à Difusão de Disco Kirby-Bauer (HUDZICKI, 2016). Os seguintes antibióticos foram testados: Ampicilina + Sulbactam 10 mg, Penicilina 10mg, Gentamicina 10mg, Cloranfenicol 30 mg e Tetraciclina 30 mg.

Determinação da filogenia das amostras por PCR quadruplex

A determinação do grupo filogenético das linhagens foi realizada através da PCR (CLERMONT et al., 2013). Nesta metodologia é possível classificar as amostras de *E. coli* dentro de um dos sete grupos filogenéticos ou como pertencente a um clado que é considerado uma espécie distinta, com características bioquímicas indistintas e geneticamente relacionada a *E. coli sensu sticto* (CLERMONT et al., 2013).

Teste de invasão

A realização do teste de interação das bactérias com células HeLa foi realizado com algumas modificações (ELSINGHORST, 1994), sendo: Vinte microlitros das amostras crescidas em meio LB O/N foram colocadas em contato com a monocamada de células HeLa e incubadas por 3 horas (período de associação) + 3 horas (período de multiplicação) a 37°C. Após esse período de associação, as bactérias associadas foram removidas das células após sucessivas lavagens com PBS e adição de 10ug de Gentamicina ao meio DMEM. Após mais 3 horas de incubação (período de multiplicação) a 37°C as lamínulas foram lavadas, fixadas e coradas com May Grunwald (50%) 5 minutos e posteriormente com Giemsa (50%), por 20 minutos. O teste foi visualizado em objetiva de 100X

Tabela 1: Indicadores utilizados para amplificação do grupo filogenético.

Indicadores	Sequencia (5'---3')	Amplificação	Referência
<i>arpA</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC TCTCCCCATACCGTACGCTA	400pb	
<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288bp	
<i>yajA</i>	CAAACGTGAAGTGTCTCAGGAG AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211bp	
<i>TspE4.C</i>	CACTATTCGTAAAGGTCATCC AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	152bp	Clermont et al., 2013
<i>Filogrupo C</i>	AGTTTTATGCCCAGTGCGAG TCTGCGCCGGTCACGCCC	219bp	
<i>Filogrupo E</i>	GATTCCATCTTGTTCAAAATATGCC GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	301bp	
<i>Controle interno</i>	CGGCGATAAAGACATCTTCAC GCAACGCGCCTGGCGGAAG	489bp	

Tabela 2. Primers utilizados neste estudo (*Temperatura de anelamento).

Genes alvos	Sequência (5'---3')	Controle positivo da reação	T °C*	Pares de base (pb)	Referência
<i>cnf-1</i>	5-GAACTTATTAAGGATAGT -3 5-CATTATTTATAACGCTG -3	<i>E. coli</i> 40MR48	55°C	543	Blanco et al. (1996)
<i>cnf-2</i>	5-AATCTAATTAAAGAGAAC-3 5-CATGCTTTGTATATCTA-3	<i>E. coli</i> B26 A	54°C	543	Blanco et al. (1996)
<i>lt-1</i>	5-CATTATTTATAACGCTG-3 5-TATCCTCTCTATATGCACAG-3	<i>E. coli</i> H10507	48°C	480	Caprioli et al. (1987)
<i>lt-2</i>	5-CTGTAGTGGAAGCTGTTATA-3 5-AGATATAATGATGGATATGTATC-3	<i>E. coli</i> UNIFESP 41	48°C	300	Roosendaal et al. (1984)
<i>sta</i>	5-GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA-3 5-AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA-3	<i>E. coli</i> 5677	50°C	190	Sekizaki et al. (1985)
<i>stx-1</i>	5-TTCGCTCTGCAATAGGTA-3 5-TTCCCCAGTTCAATGTAAGAT-3	<i>E. coli</i> O157:H7	50°C	555	Paton et al. (1995)
<i>stx-2</i>	5-GTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTTC-3 5-AGGGGTCGATATCTCTGTCC-3	<i>E. coli</i> O157:H7 EDL933	50°C	118	Paton et al. (1993)
F5 (K99)	5-TATTATCTTAGGTGGTATGG-3 5-GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTTC-3	<i>E. coli</i> F5 K99	50°C	314	Roosendaal et al. (1984)
F41	5-GCATCAGCGGCAGTATCT-3 5-GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT-3	<i>E. coli</i> O141	50°C	380	Fidock et al. (1989)

*Temperatura de anelamento.

Para a classificação das amostras, primeiramente é realizada uma PCR quadruplex para os genes *chuA*, *yjaA* e para o fragmento TspE4.C2, o padrão de amplificação obtido na quadruplex permite ou a classificação definitiva (para grupos A, B1, B2, e F) ou parcial das amostras (para os grupos A ou C, D ou E e clado I), sendo que no caso de classificação parcial, uma segunda PCR, específica para cada caso, é realizada para classificar definitivamente as amostras.

Sequenciamento do DNA da amostra 2A.

A amostra 2 A foi enviada para a empresa Neoprospecta Pesquisa e Consultoria S.A (Florianópolis, Santa Catarina, Brazil) para ter seu sequenciamento determinado.

Preparo da biblioteca genômica

As bibliotecas de DNA foram preparadas utilizando-se o kit Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina Inc., USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Sequenciamento da amostra

A biblioteca genômica da amostra de *E. coli* foi sequenciada utilizando-se o equipamento Miseq Sequencing System (Illumina Inc., USA), com o Kit V2, 250 ciclos e sequenciamento paired-end.

Anotação dos genes

A anotação dos genes foi realizada através da utilização dos programas Prokka (v1.12) e blast 2.9.0. Foi utilizado os parâmetros padrão no programa Prokka, enquanto na utilização do programa blastx foi determinado um valor de corte de e-value 0,001. As sequências do genoma foram confrontadas com as sequências não redundante (*non redundant*) disponíveis na base de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), sendo considerados os alinhamentos que apresentaram uma alta identidade. As sequências também foram anotadas quanto a ontologia gênica (GO) foi utilizado como genoma de referência a linhagem K12, e o programa utilizado foi o Cytoscape/Bingo (v3,0). Foram considerados significativamente enriquecidos os termos que apresentaram o valor de p ajustado <0,05. A análise será feita pelo alinhamento das sequências genéticas obtidas com sequências previamente publicadas no genBank.

As sequências genéticas obtidas de prováveis fatores de virulência serão utilizadas futuramente para ensaios fenotípicos e eventualmente utilizados para produção de vacina.

RESULTADOS

Sorologia

Todos os antissoros testados, polivalentes anti *E. coli* enteropatogênica clássica: polivalente A: Anti O26,O55, O55, O111, O119; Polivalente B : Anti O112ac, O124, O143, O164, O167 e poli C: Anti O86, O126, O127, O128 e seus respectivos monovalentes e para a determinação dos sorogrupos de EIEC foram utilizados os soros polivalentes *E. coli* enteroinvasora poli A: Anti O28ac, O29, O136, O144, O152 e poli B: Ant O112ac, O 124, O143, O164, O167 e soro anti-O157, foram negativos.

Filogenia Quadruplex

Dos 4 marcadores gênicos testados no multiplex, foram ampliados os genes *arpA* (400pb) e o fragmento TSPE (152 pb) (Figura 1).

A amostra (2 foi plaqueada e 3 colônias foram submetidas a pesquisa de marcadores genicos pela técnica de PCR multiplex. Foram testados 4 marcadores gênicos no multiplex, tendo amplificado os genes *arpA* (400pb) e o fragmento TSPE (152 pb) indicando que a mesma pertence ao filogruppo B1. A Figura 1 mostra os resultados obtidos

PCR para os genes de virulência característicos de NTEC

Os ensaios de PCR realizados para pesquisar os genes de virulência característicos de NTEC tais como Sta, Stx-1, Stx-2 e F5(K99), Cnf-1 e Cnf-2 mostraram-se todos negativos para a amostra 2A (Figura 2).

PCR para os genes de virulência característicos de EHEC, STEC e ETEC

Os resultados não revelaram a presença dos genes de virulência característicos de DEC: *eae*, *ipaH*, *stx1*, *stx2*, *sta lta* (Figura 3).

Teste de invasão

Os testes em cultura de células HeLa evidenciaram uma forte capacidade invasora dessa bactéria (Figura 5).

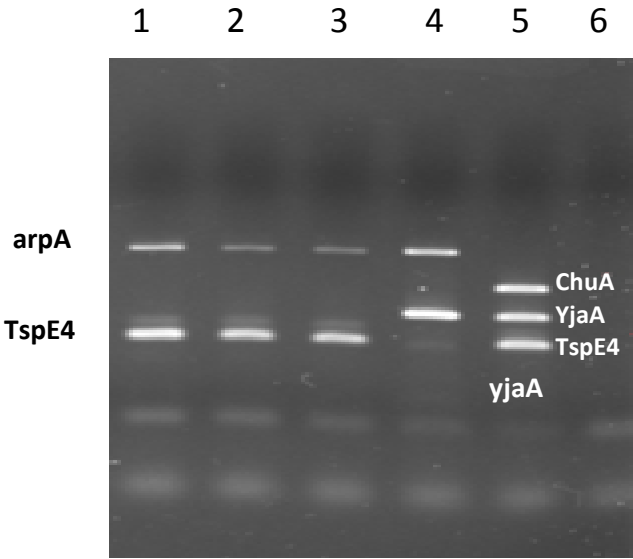


Figura 1: Mostra o PCR multiplex onde foram testados os marcadores arpA, chuA, yjaA, TspE.

Tabela 2: O esquema abaixo mostra a descrição dos grupos filogenéticos encontrados na amostra.

Cepa	arpA	<u>chuA</u>	yjaA	TSPE	Grupo Amostral
1- Amostra 2 A	+	-	-	+	B1
2- Amostra 2 A	+	-	-	+	B1
3- Amostra 2 A	+	-	-	+	B1
4- Controle C600 (neg)	+	-	+	-	A/C
5- RS861	-	+	+	+	B2
6- Vazio	-	-	-	-	-



Figura 2: PCR convencional para a amostra (2 A) utilizando os primers de interesse e os produtos obtidos Canaletal 100 pb, 2 Controle -, #3 *E. coli*

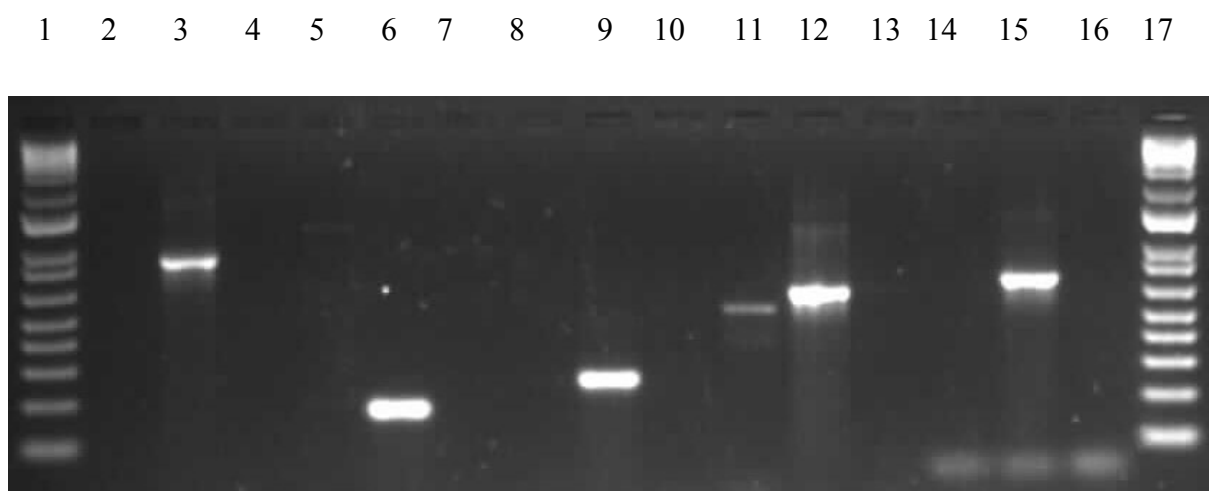


Figura 3. PCR convencional para os genes: *eae*, *ipaH*, *stx1*, *stx2* e *lta*.

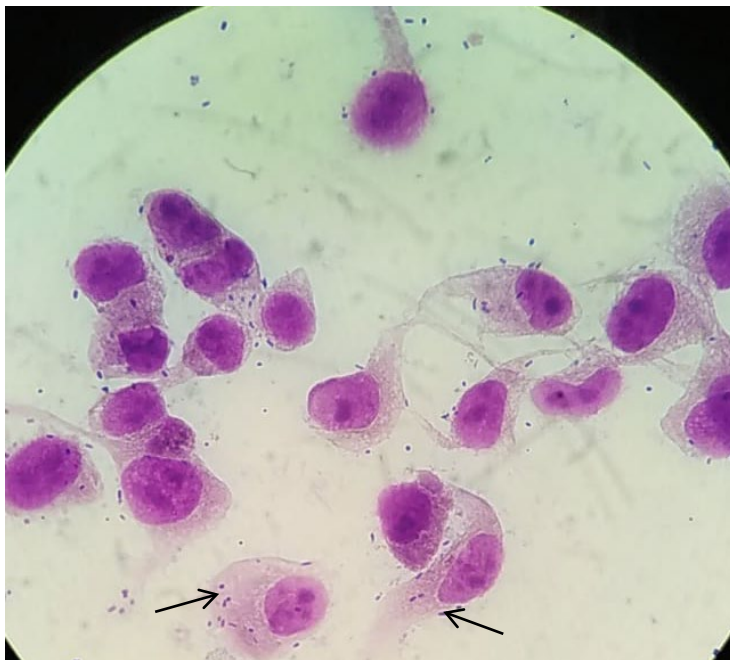


Figura 5. Teste de invasão as células HeLa. A seta aponta para bactérias invadindo o citoplasma

DISCUSSÃO

A gastroenterite neonatal em bezerros gera perda econômica para produtores de gado de corte e leite. Estima-se, mundialmente, que a perda econômica causada por diarreia em bezerros leiteiros neonatos esteja entre 20% e 52%, com custo aproximado de US\$33,5 de animais leiteiros e podendo a mortalidade chegar a 34%.

Surtos de diarreia são comuns em fazendas brasileiras e o aumento dos surtos têm sido na região do Oeste Paulista, São Paulo, Brasil. Nas safras de 2016, 2017 e 2018, a fazenda teve uma perda econômica de R\$162.186,00, devido a gastos com o tratamento com antibioticoterapia e a morte de 106 bezerros recém-nascidos.

A amostra identificada nesse estudo se trata de uma *E. coli* com múltipla resistência a drogas antimicrobianas e de alta capacidade invasora. Essa bactéria é um importante agente causador de diarreia em bovinos neonatos, sendo até o presente momento identificados 5 patótipos causadores da patologia nesses animais: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC) (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014). No presente trabalho foi encontrado genes de virulência que caracterizam a amostra estudada como *E. coli* pertencente a uma nova categoria de *E. coli* a CIEC (calf invasive *E. coli*), uma vez que esta bactéria não apresentou nenhum fator de virulência característico de outras categorias de *E. coli*, mas apresentou a capacidade de invadir cultura de células epiteliais *in vitro*, de expressar a fimbria P e de causar enterite catarro hemorrágica e levando os bezerros neonatos a óbito.

A alta resistência aos antimicrobianos Penicilina, Tetraciclina e Ampicilina observados nesse estudo para a amostras de CIEC também foram observados na literatura (VARGAS et al., 2017). Por sua vez, o baixo percentual de resistência aos antimicrobianos Cloranfenicol, Ampicilina e Gentamicina discorda de nossos achados, uma vez que a amostra de CIEC também foi resistente a esses fármacos. No entanto nossos dados estão de acordo como os estudos de Rigobelo et al. (2006) que analisaram 173 amostras frente a 10 antimicrobianos e verificaram que todos os isolados mostraram resistência para pelo menos dois agentes antimicrobianos, sendo o achado de multirresistência a drogas antimicrobianas seja concordante com ao presente trabalho. Embora se constate que o percentual de resistência aos antimicrobianos varie entre os estudos, acredita-se que o uso indiscriminado de terapias antimicrobianas como prática comum entre as propriedades rurais, contribua para a resistência bacteriana aos fármacos.

Segundo os dados de Vargas et al. (2017) para a pesquisa dos genes *Stx1*, *eae*, F41, K99 e *Sta* em 40 amostras provenientes de 40 bezerros neonatos diarreicos observou que 70% das amostras não apresentaram os fatores pesquisados e 30% apresentaram ao menos um fator de virulência. A alta percentagem de ausência de determinantes de virulência condiz com os

resultados do presente trabalho e que também não identificou a presença de nenhum desses fatores de virulência na amostra estudada. Embora os autores concluam que na Região Sul do Rio Grande do Sul o fator de virulência mais encontrado proveniente de fezes de bezerro com ou sem diarreia foi o *Stx1*, característico de STEC, é provável que a maior ocorrência de isolados de *E. coli* positivos para o fator de virulência *Stx1* tenha ocorrido pelo fato dos bovinos serem os principais reservatórios deste tipo de bactéria reforçando que as STEC são bactérias da microbiota normal nesses animais.

Testes de associação em cultura em células HeLa foram realizados e mostraram a alta capacidade invasora das amostras CIEC. A amostra teve a capacidade de invadir células epiteliais *in vitro*, sugerindo, portanto, um fator de virulência que permite a invasão das células intestinais dos bezerros neonatos e causar a patologia observada na necropsia: congestão e edema de alça intestinal, sendo o mesmo acentuado em mucosa e submucosa, além de degeneração e necrose multifocal do epitélio superficial das vilosidades intestinais e alças intestinais (BOST et al., 2003). Grande parte das amostras de NTEC possuem propriedades invasivas, causando septicemia, bacteremia e infecções em órgãos internos (BOST et al., 2003), tais como os observados pelo anatomopatológico do animais aqui estudado.

Os dados de filogenia sugerem que as amostras de CIEC pertencem ao filogruppo B1 e, que de acordo com os dados da literatura, o filogruppo B1 é aquele onde a maioria das amostras patogênicas de *E. coli* se agrupam como as amostras de EAEC, EHEC (não O157:H7) e ETEC (DALE; WOODFORD, 2015).

A análise genômica revelou que essa amostra realmente não pertence a nenhuma categoria de *E. coli* já descrita na literatura, pelo fato de não possuir os principais genes de virulência já descritos que definem as mesmas. No entanto, verificou-se a presença do gene *FdeC* (Fator adherence E. coli). Esse gene codifica para uma proteína descrita como “intimin-like protein” com semelhança estrutural a outras moléculas de adesão e envolvida na colonização dos rins em modelo de infecção urinária em camundongos (NESTA et al., 2012).

A análise da proteína *FdeC* revelou grande similaridade estrutural com invasiva e fatores de virulência bacteriana conhecidos por se ligarem às células hospedeiras. O gene *fdeC* está presente em diferentes patotipos de *E. coli*, em 92 a 100 % das amostras de *E. coli* de origem intestinal tanto em animais como em humanos. Pode-se sugerir que os genes *fdeC* possam contribuir para a virulência, como uma adesina essencial para a infecção no hospedeiro. Nas cepas de UPEC, por exemplo, a adesão é de vital importância para superar as defesas do hospedeiro no trato urinário e resistir ao efeito de “lavagem” da urina.

O papel da *FdeC* na colonização de *E. coli* aos tecidos do hospedeiro foi verificado não apenas pela evidência *in vivo* que mostra uma diminuição de colonização dos mutantes *fdeC* durante a infecção experimental do trato urinário em camundongos, mas também pelo fato dos *fdeC* recombinantes se ligarem fortemente as células epiteliais das vias urinarias e que a sua

expressão na superfície da bactéria dependente do contato com a célula hospedeira (NESTA et al., 2012).

Além do papel comprovado de fdcE na patogênese de amostras de *E. coli* essa adesina também é um forte candidato para ser utilizado como um antígeno para a construção de uma vacina de amplo espectro contra *E. coli* de origem intestinal e extra intestinal. No entanto, mais estudos a respeito de sua utilização em animais como bovinos deverão ser realizados para tal.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), no Brasil - Finance code 001.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Os patrocinadores fundadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo; na coleta, análise ou interpretação de dados; na redação do manuscrito e na decisão de publicar os resultados.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOST, S. VAN et al. Multiplex PCRs for Identification of Necrotoxicogenic *Escherichia coli*. v. 41, n. 9, p. 4480–4482, 2003.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited : improvement of specificity and detection of new phylo-groups. v. 5, p. 58–65, 2013.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 811–

818, set. 2014.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

DALE, A. P.; WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease , carriage and clones. **Journal of Infection**, n. September, p. 1–12, 2015.

DUARTE, R. S. Prejuízos Econômicos por Condenações de Vísceras De Bovinos Com Hidatidose em Matadouros- Vísceras De Bovinos Com Hidatidose Em Matadouros-Frigoríficos do Município de Farroupilhas/RS. p. 8, 2015.

EL-SEEDY, F. et al. Prevalence of *Salmonella* and *E. coli* in neonatal diarrheic calves. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 45–51, mar. 2016.

ELSINGHORST, E. A. Day Prior to Assay. v. 236, n. 1979, 1994.

HUDZICKI, J. **Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol**. [s.l.] asm Pub2Web, dez. 2016.

NESTA, B. et al. FdeC , a Novel Broadly Conserved *Escherichia coli* Adhesin Eliciting Protection against Urinary Tract Infections. v. 3, n. 2, p. 1–9, 2012.

RIGOBELLO, E. C. et al. Virulence factors of. p. 305–310, 2006.

SALVADORI, M ; VALADARES, M; LEITE, D; BLANCO, J; YANO, T. VIRULENCE FACTORS OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM CALVES WITH DIARRHEA IN BRAZIL. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 230–235, 2003.

VARGAS, J. F. et al. Identificação de fatores de virulência de isolados de *Escherichia coli* oriundos de fezes de bezerros na região Sul do Brasil Identification of Virulence Factors of *Escherichia coli* Isolates from Fecal Samples of Calves in Southern Brazil. 2017.

ANEXO A – PARECER FINAL

Certificado

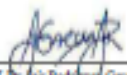
<http://www.unoeste.br/SGP/certificados/vw.asp?b=713f411c388bd8bf...>

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação****PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica****Parecer Final**

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "SEQUENCIAMENTO DE E. COLI ISOLADA DE SURTO DE DIARRÉIA EM BEZERROS", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 4499 e tendo como participante(s) ROBSON DIEGO SILVA GONCALVES (discente), YARA FELIPPE BUENO CROSCIOLI (discente), ELOISA NASCIMENTO JORGE (discente), ROSA MARIA SILVA (participante externo), ROGERIA KELLER (docente), HERMANN BREMER NETO (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 6 de Julho de 2018.



Prof. Dr. José Roberto Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI

ANEXO B – ESTRUTURA DO ARTIGO

Estrutura do artigo

O texto deve compreender as seguintes seções: Resumo, Palavras-chave, Introdução, Materiais (ou Pacientes) e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências. Tabelas, figuras e legendas para figuras devem estar em folhas separadas.

Cartas para o editor devem ser:

- Menos de 1000 palavras de comprimento
- Menos de 10 referências
- Máximo de 2 figuras ou tabelas

Informações essenciais da página de *título*

- **Título.** Consiste e informativo. Títulos são frequentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível. Seu título não deve exceder 100 letras.
- **Executando título** Você deve incluir um título em execução que não exceda 50 letras.
- **Nomes e afiliações dos autores.** Onde o nome da família pode ser ambíguo (por exemplo, um nome duplo), indique isso claramente. Apresente os endereços de afiliação dos autores (onde o trabalho real foi feito) abaixo dos nomes. Indique todas as afiliações com uma letra em sobrescrito minúscula imediatamente após o nome do autor e em frente ao endereço apropriado. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.
- **Autor correspondente.** Indique claramente quem irá lidar com a correspondência em todas as fases da arbitragem e publicação, também pós-publicação. **Assegure-se de que os números de telefone (com código de país e área) sejam fornecidos além do endereço de e-mail e do endereço postal completo. Os detalhes de contato devem ser mantidos atualizados pelo autor correspondente.**
- **Endereço presente / permanente.** Se um autor se mudou desde que o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava em visita no momento, um "endereço atual" (ou "endereço permanente") pode ser indicado como uma nota de rodapé para o nome desse autor. O endereço no qual o autor realmente fez o trabalho deve ser mantido como o endereço de afiliação principal. Números árabes sobrescritos são usados para tais notas de rodapé.

Destaques

Destaques são obrigatórios para este periódico. Eles consistem em uma pequena coleção de pontos que transmitem os principais resultados do artigo e devem ser enviados em um arquivo editável separado

no sistema de submissão on-line. Por favor, use 'Destaques' no nome do arquivo e inclua de 3 a 5 marcadores (máximo de 85 caracteres, incluindo espaços, por ponto de marcador). Você pode ver os destaques em nosso site de informações.

Resumo

Um resumo estruturado de seu manuscrito, com um máximo de 200 palavras, resumindo o conteúdo, deve ser fornecido em uma folha separada após a página de título. Isso deve ser dividido em seções intituladas Objetivos; Métodos; Resultados; Conclusões

Resumo gráfico

Embora um resumo gráfico seja opcional, seu uso é incentivado, pois atrai mais atenção para o artigo on-line. O resumo gráfico deve resumir o conteúdo do artigo em uma forma concisa e pictórica projetada para capturar a atenção de um público amplo. Os resumos gráficos devem ser enviados como um arquivo separado no sistema de submissão online. Tamanho da imagem: forneça uma imagem com um mínimo de 531×1328 pixels (h $\times$ w) ou proporcionalmente mais. A imagem deve ser legível em um tamanho de 5×13 cm usando uma resolução de tela regular de 96 dpi. Tipos de arquivos preferidos: arquivos TIFF, EPS, PDF ou MS Office. Você pode ver os Resumos Gráficos de Exemplo em [nosso site de informações](#). Autores podem fazer uso dos Serviços de Ilustração da Elsevier para garantir a melhor apresentação de suas imagens e de acordo com todos os requisitos técnicos.

Palavras-chave

Os autores devem fornecer palavras-chave de seu resumo. Eles devem incluir aqueles publicados no Medical Subject Headings - Lista Alfabética Anotada, Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA (novo volume a cada ano).

Unidades e Abreviaturas

Os micróbios devem ser referidos por seus nomes científicos de acordo com o sistema binominal usado na última edição do Bergey's Manual of Bacteriology Systematic (The Williams and Wilkins Co.). Quando mencionado pela primeira vez, o nome deve estar completo e sublinhado - para denotar o *itálico*. Daí em diante, o gênero deve ser abreviado para a sua letra inicial, por exemplo, 'S. aureus' não 'Staph. aureus'. Se a abreviação for susceptível de causar confusão ou tornar intencional o (s) significado (s) pretendido (s), os nomes dos organismos devem ser apresentados na íntegra. Apenas os nomes incluídos nas Listas Aprovadas de Nomes Bacterianos (Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420)

e / ou que tenham sido validamente publicados no Int J Syst Bacteriol desde janeiro de 1980 são aceitáveis. Se houver uma boa razão para usar um nome que não tenha em pé na nomenclatura, ele deve ser colocado entre aspas e uma declaração apropriada sobre seu uso feita no texto (por exemplo, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). Símbolos para unidades de medida devem estar de acordo com o Systeme International (SI). No entanto, a pressão arterial deve ser expressa em mmHg e a hemoglobina em g / dl. As drogas devem ser referidas por seus nomes genéricos, e não proprietários; para orientação, a edição mais recente do British National Formulary deve ser consultada.

Agradecimentos

Agrupe os agradecimentos em uma seção separada no final do artigo antes das referências. Todos os contribuintes que não atenderem aos critérios de autoria, conforme definido acima, devem ser listados em uma seção de agradecimentos. Exemplos daqueles que podem ser reconhecidos incluem uma pessoa que forneceu ajuda puramente técnica, assistência por escrito ou um chefe de departamento que forneceu apenas apoio geral. Os autores devem divulgar se tiveram alguma assistência por escrito e identificar a entidade que pagou por essa assistência.

Formatação de fontes de financiamento

Citar fontes de financiamento desta forma padrão para facilitar o cumprimento dos requisitos do financiador:

Financiamento: Este trabalho foi apoiado pelo National Institutes of Health [conceder números xxxx, yyyy]; a Fundação Bill & Melinda Gates, Seattle, WA [número de concessão zzzz]; e os Institutos de Paz dos Estados Unidos [grant number aaaa].

Não é necessário incluir descrições detalhadas sobre o programa ou tipo de subsídios e prêmios. Quando o financiamento for proveniente de uma bolsa em bloco ou de outros recursos disponíveis para uma universidade, faculdade ou outra instituição de pesquisa, envie o nome do instituto ou organização que forneceu o financiamento.

Se nenhum financiamento tiver sido fornecido para a pesquisa, inclua a seguinte frase:

Esta pesquisa não recebeu nenhuma concessão específica de agências de financiamento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Notas de rodapé

Devem ser usadas com moderação. Numere-os consecutivamente ao longo do artigo. Muitos processadores de texto criam notas de rodapé no texto e esse recurso pode ser usado. Se este não for o caso, indique a posição das notas de rodapé no texto e apresente as notas de rodapé separadamente no final do artigo.

Obra de arte

Pontos gerais

- as ilustrações devem ser numeradas em algarismos arábicos (por exemplo, Fig. 3) de acordo com sua sequência no texto.
- Cada figura deve ter um título que deixe claro seu significado sem referência ao texto.
- A identidade dos pacientes mostrados nas fotografias deve ser ocultada ou devem dar consentimento por escrito; uma cópia do consentimento deve acompanhar a fotografia simples mascaramento de olhos em uma fotografia pode não ser suficiente.
- Certifique-se de usar letras e tamanhos uniformes de seu trabalho artístico original.
- Incorpore as fontes usadas se o aplicativo fornecer essa opção.
- Procure usar as seguintes fontes em suas ilustrações: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol ou use fontes semelhantes.
- Use uma convenção de nomenclatura lógica para seus arquivos de ilustrações.
- Forneça legendas para ilustrações separadamente.
- Dimensione as ilustrações perto das dimensões desejadas da versão impressa.
- Envie cada ilustração como um arquivo separado.

Um guia detalhado sobre arte eletrônica está disponível em nosso site:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Você está convidado a visitar este site; alguns trechos da informação detalhada são dados aqui.

Formatos

Se o seu trabalho artístico eletrônico for criado em um aplicativo do Microsoft Office (Word, Power/Point, Excel), forneça 'como está' no formato de documento nativo.

Independentemente do aplicativo usado diferente do Microsoft Office, quando a arte eletrônica estiver finalizada, salve como 'Salvar como' ou converta as imagens em um dos seguintes formatos (observe os requisitos de resolução para desenhos de linhas, meios-tons e combinações de linha / meio tom dadas abaixo):

EPS (ou PDF): desenhos vetoriais, incorporar todas as fontes usadas.

TIFF (ou JPEG): fotografias coloridas ou em escala de cinza (meios-tons), mantenha no mínimo 300 dpi.

TIFF (ou JPEG): Desenhos de linha Bitmap (pixels pretos e brancos puros), mantenha no mínimo 1000 dpi.

TIFF (ou JPEG): combina linhas / tons de bitmap (cores ou tons de cinza), mantendo no mínimo 500 dpi.

Por favor não:

- fornece arquivos otimizados para uso na tela (por exemplo, GIF, BMP, PICT, WPG); estes geralmente possuem um número baixo de pixels e um conjunto limitado de cores;
- forneça arquivos com resolução muito baixa;
- envie gráficos que são desproporcionalmente grandes para o conteúdo.

Trabalho artístico colorido

Certifique-se de que os arquivos de trabalho artístico estejam em um formato aceitável (arquivos TIFF (ou JPEG), EPS (ou PDF) ou MS Office) e com a resolução correta. Se, junto com o artigo aceito, você enviar valores em cores utilizáveis, a Elsevier garantirá, sem custo adicional, que esses números aparecerão em cores on-line (por exemplo, Science Direct e outros sites), além da reprodução em cores impressa. Mais informações sobre a preparação de arte eletrônica .

Legenda das figuras

Certifique-se de que cada ilustração tenha uma legenda. Uma legenda deve conter um título breve (não na própria figura) e uma descrição da ilustração. Mantenha o texto nas próprias ilustrações no mínimo, mas explique todos os símbolos e abreviações usadas.

Tabelas

As tabelas devem ser numeradas em algarismos arábicos (por exemplo, Tabela 3). Cada um deve estar em uma folha separada e ter um título que deixe claro seu significado sem referência ao texto incluído.

Referências da Web

No mínimo, a URL completa deve ser fornecida e a data em que a referência foi acessada pela última vez. Qualquer informação adicional, se conhecida (DOI, nomes de autores, datas, referência a uma publicação de origem, etc.), também deve ser fornecida. As referências da Web podem ser listadas separadamente (por exemplo, após a lista de referências) sob um cabeçalho diferente, se desejado, ou podem ser incluídas na lista de referências.

Referências de dados

Esta revista encoraja-o a citar conjuntos de dados subjacentes ou relevantes no seu manuscrito, citando-os no seu texto e incluindo uma referência de dados na sua Lista de Referências. As referências de dados devem incluir os seguintes elementos: nome (s) do autor, título do conjunto de dados, repositório de dados, versão (quando disponível), ano e identificador persistente global. Adicione o [dataset] imediatamente antes da referência para que possamos identificá-lo corretamente como uma referência de dados. O identificador [dataset] não aparecerá em seu artigo publicado.

Software de gerenciamento de referência

A maioria dos periódicos da Elsevier tem seu modelo de referência disponível em muitos dos produtos de software de gerenciamento de referência mais populares. Estes incluem todos os produtos que suportam estilos Citation Style Language, como o Mendeley. Usando plug-ins de citação desses produtos, os autores só precisam selecionar o modelo de diário apropriado ao preparar o artigo, após o qual citações e bibliografias serão automaticamente formatadas no estilo da revista. Se ainda não houver um modelo disponível para este periódico, siga o formato das referências e citações de exemplo, conforme mostrado neste Guia. Se você usar um software de gerenciamento de referência, certifique-se de remover todos os códigos de campo antes de enviar o manuscrito eletrônico. Mais informações sobre como remover códigos de campo de diferentes softwares de gerenciamento de referência.

Os usuários do Mendeley Desktop podem instalar facilmente o estilo de referência para este periódico clicando no seguinte link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-infection>. Ao preparar seu manuscrito, você poderá então para selecionar este estilo usando os plug-ins Mendeley para o Microsoft Word ou LibreOffice.

Formatação de referência

Não há requisitos rigorosos na formatação de referência no envio. As referências podem estar em qualquer estilo ou formato, desde que o estilo seja consistente. Quando aplicável, nome (s) do (s) autor (es), título do periódico / título do livro, título do capítulo / artigo, ano de publicação, número do volume / capítulo do livro e número do artigo ou paginação devem estar presentes. O uso do DOI é altamente encorajado. O estilo de referência usado pela revista será aplicado ao artigo aceito pela Elsevier na etapa de prova. Observe que os dados ausentes serão destacados no estágio de prova para o autor corrigir. Se você deseja formatar as referências por conta própria, elas devem ser organizadas de acordo com os seguintes exemplos:

Estilo de referência

O estilo de referência do periódico segue o estilo 'Vancouver' (Br Med J 1982; 284: 1766-1770). Quando o número de autores é seis ou menos, os nomes e as iniciais de todos devem ser dados na lista de referências; quando sete ou mais, os seis primeiros nomes devem ser citados, seguidos de et al. Os autores são responsáveis por verificar a exatidão de todas as referências e garantir que todas as informações fornecidas no texto sejam concordantes com as da lista de referências. Exemplo: 1. McConkey B, Crockson RA, Crockson AP, Wilkinson A R. O efeito de alguns anti-inflamatórios sobre as proteínas de fase aguda na artrite reumatóide. QJ Med 1973; 42: 785-791. As referências aos capítulos de livros devem ser apresentadas: Exemplo: 1. Weinstein L. Schwartz M N. Propriedades patogênicas de microrganismos invasores. Em: Soderman WA Jr., Soderman WA, eds. Fisiologia patológica: mecanismos da doença. WB Saunders, 1974: 457-472. As referências citadas unicamente em tabelas e / ou legendas a figuras devem ser numeradas de acordo com a sequência estabelecida pela primeira menção no texto da tabela ou ilustração. Os cadernos enviados com referências ou outras características que não cumpram estas instruções serão devolvidos, e não considerado para publicação até ser reenviado no estilo requerido. Quando citar um diário da Elsevier, inclua o identificador de objeto digital (DOI), se indicado, na página de título do artigo. Por favor, note os seguintes exemplos. 1. Munday PE. Doença inflamatória pélvica - uma abordagem baseada em evidências para o diagnóstico. J Infect 2000; 40: 31-41, <https://doi.org/10.1053/jinf.1999.06092>. Colebunders R, febre hemorrágica Borchert M. Ebola - uma revisão. J Infect, <https://doi.org/10.1053/jinf.1999.0603>. As referências citadas unicamente em tabelas e / ou legendas a figuras devem ser numeradas de acordo com a sequência estabelecida pela primeira menção no texto da tabela ou ilustração. Os cadernos enviados com referências ou outras características que não cumpram estas instruções serão devolvidos, e não considerado para publicação até ser reenviado no estilo requerido. Quando citar um diário da Elsevier, inclua o identificador de objeto digital (DOI), se indicado, na página de título do artigo. Por favor, note os seguintes exemplos. 1. Munday PE. Doença inflamatória pélvica - uma abordagem baseada em evidências para o diagnóstico. J Infect 2000; 40: 31-41, <https://doi.org/10.1053/jinf.1999.06092>. Colebunders R, febre hemorrágica Borchert M. Ebola - uma revisão. J Infect, <https://doi.org/10.1053/jinf.1999.0603>. As referências citadas unicamente em tabelas e / ou legendas a figuras devem ser numeradas de acordo com a sequência estabelecida pela primeira menção no texto da tabela ou ilustração. Os cadernos enviados com referências ou outras características que não cumpram estas instruções serão devolvidos, e não considerado para publicação até ser reenviado no estilo requerido. Quando citar um diário da Elsevier, inclua o identificador de objeto digital (DOI), se indicado, na página de título do artigo. Por favor, note os seguintes exemplos. 1. Munday PE. Doença inflamatória pélvica - uma abordagem baseada em evidências para o

diagnóstico. J Infect 2000; 40: 31-41, <https://doi.org/10.1053/jinf.1999.06092>. Colebunders R, febre hemorrágica Borchert M. Ebola - uma revisão. J Infect, <https://doi.org/10.1053/jinf.1999.0603>.

Sequências de DNA e números de acesso do GenBank

Muitas revistas citam "números de acesso a genes" em seus textos corridos e notas de rodapé. Os números de acesso a genes referem-se a genes ou seqüências de DNA sobre as quais informações adicionais podem ser encontradas nos bancos de dados do Centro Nacional de Informação Biotécnica (NCBI) da National Library of Medicine. Os autores da Elsevier que desejam permitir que outros cientistas usem os números de acesso citados em seus documentos por meio de links para essas fontes, devem digitar essas informações da seguinte maneira: Para cada número de acesso citado em um artigo, os autores devem digitar o número de acesso em **negrito texto sublinhado**. As letras no número de acesso devem sempre ser capitalizadas (veja o exemplo abaixo). Esta combinação de letras e formato permitirá à Elsevier **Exemplo** : "Nº de acesso do GenBank **AI631510** , **AI631511** , **AI632198** e **BF223228**), um tumor de célula B de uma leucemia linfática crônica (número de acesso do Banco Gen **BE675048**) e um linfoma de célula T (número de acesso do GenBank **AA361117**)" . Os autores são encorajados a verificar os números de acesso usados com muito cuidado. **Um erro em uma letra ou número pode resultar em um link inativo.** Na versão final do **artigo impresso** , o texto do número de acesso não aparecerá em negrito ou sublinhado. Na versão final da **cópia eletrônica**, o texto do número de acesso será vinculado à fonte apropriada nos bancos de dados do NCBI, permitindo que os leitores acessem diretamente a essa fonte a partir do artigo.

Visualização de dados

Inclua visualizações de dados interativos em sua publicação e permita que seus leitores interajam e se envolvam mais de perto com sua pesquisa. Siga as instruções aqui para descobrir as opções de visualização de dados disponíveis e como incluí-las em seu artigo.

Material suplementar

Material suplementar, como aplicativos, imagens e clipes de som, pode ser publicado com o seu artigo para aprimorá-lo. Os itens suplementares enviados são publicados exatamente como são recebidos (os

arquivos do Excel ou do PowerPoint aparecerão como on-line). Envie seu material juntamente com o artigo e forneça uma legenda descritiva e concisa para cada arquivo suplementar. Se você deseja fazer alterações no material suplementar durante qualquer etapa do processo, forneça um arquivo atualizado. Não anote nenhuma correção em uma versão anterior. Por favor, desligue a opção 'Track Changes' nos arquivos do Microsoft Office, pois eles aparecerão na versão publicada.

Dados da pesquisa

Esta revista encoraja e permite que você compartilhe dados que suportam sua publicação de pesquisa quando apropriado, e permite interligar os dados com seus artigos publicados. Os dados da pesquisa referem-se aos resultados das observações ou experimentações que validam os resultados da pesquisa. Para facilitar a reprodutibilidade e a reutilização de dados, este periódico também incentiva você a compartilhar seu software, código, modelos, algoritmos, protocolos, métodos e outros materiais úteis relacionados ao projeto.

Abaixo estão algumas maneiras pelas quais você pode associar dados ao seu artigo ou fazer uma declaração sobre a disponibilidade de seus dados ao enviar seu manuscrito. Se você está compartilhando dados de uma destas maneiras, você é encorajado a citar os dados em seu manuscrito e lista de referências. Por favor, consulte a seção "Referências" para mais informações sobre a citação de dados. Para obter mais informações sobre como depositar, compartilhar e usar dados de pesquisa e outros materiais de pesquisa relevantes, visite a página de dados de pesquisa .

Vinculação de dados

Se você disponibilizou seus dados de pesquisa em um repositório de dados, poderá vincular seu artigo diretamente ao conjunto de dados. A Elsevier colabora com vários repositórios para vincular artigos no Science Direct com repositórios relevantes, dando aos leitores acesso a dados subjacentes que lhes proporcionam um melhor entendimento da pesquisa descrita.

Existem diferentes maneiras de vincular seus conjuntos de dados ao seu artigo. Quando disponível, você pode vincular diretamente seu conjunto de dados ao seu artigo, fornecendo as informações relevantes no sistema de envio. Para mais informações, visite a página de links do banco de dados .

Para repositórios de dados suportados, um banner de repositório aparecerá automaticamente ao lado do artigo publicado no Science Direct.

Além disso, você pode vincular dados ou entidades relevantes através de identificadores dentro do texto do seu manuscrito, usando o seguinte formato: Banco de dados: xxxx (por exemplo, TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

Este periódico suporta Mendeley Data, permitindo que você deposite quaisquer dados de pesquisa (incluindo dados brutos e processados, vídeo, código, software, algoritmos, protocolos e métodos) associados ao seu manuscrito em um repositório de acesso livre e livre de uso. Durante o processo de submissão, após o upload do seu manuscrito, você terá a oportunidade de enviar seus conjuntos de dados relevantes diretamente para a *Mendeley Data*. Os conjuntos de dados serão listados e diretamente acessíveis aos leitores próximos ao artigo publicado on-line.

Para mais informações, visite a página Mendeley Data for journals .

Declaração de dados

Para promover a transparência, recomendamos que você informe a disponibilidade de seus dados no envio. Isso pode ser um requisito do seu órgão ou instituição de financiamento. Se os seus dados não estiverem disponíveis para acesso ou inadequados para publicação, você terá a oportunidade de indicar por que durante o processo de envio, por exemplo, declarando que os dados da pesquisa são confidenciais. A declaração aparecerá com o seu artigo publicado no Science Direct. Para mais informações, visite a página Declaração de dados .