

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/02/2022.



Instituto de  
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Diversidade genética e pesquisa de *Escherichia coli*, produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL), isolada de leite de vacas com mastite clínica.

**HENRIQUE ORSI**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microorganismos.

*Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall*

**BOTUCATU – SP**

**2020**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Diversidade genética e pesquisa de *Escherichia coli*, produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL), isolada de leite de vacas com mastite clínica.

**HENRIQUE ORSI**

**VERA LÚCIA MORES RALL**

**RODRIGO TAVANELLI HERNANDES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microorganismos.

*Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall*

**BOTUCATU – SP**

**2020**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Orsi, Henrique.

Diversidade genética e pesquisa de Escherichia coli, produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL), isolada de leite de vacas com mastite clínica / Henrique Orsi. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vera Lúcia Mores Rall

Coorientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez

Capes: 21201021

1. Bovino - Doenças. 2. Mastite. 3. Escherichia coli.  
4. Biofilmes. 5. beta-Lactamases.

Palavras-chave: Biofilme; Grupo filogenético; KPC; PFGE.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Rosa Cristina Laurindo Orsi, meu pai Orsini Orsi Filho e minhas irmãs Carolina Orsi e Patricia Orsi, por me proporcionarem um ambiente tranquilo de família e me darem todo o suporte necessário nos dias em que cheguei em casa exausto;

Aos meus amigos Gabriel, João e Ulisses por manterem este grupo unido por tantos anos mesmo que tenhamos seguido caminhos diferentes ao terminarmos o ensino médio, por me darem muito apoio e pelas divagações filosóficas;

Aos meus colegas de banda Jorge, Lennon, Matheus e Raphael por sempre me motivarem a crescer e me fazerem assumir um posto que eu jamais teria chego sozinho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro;

À todos os funcionários do extinto Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial: à Sílvia que sempre manteve tudo limpo e agradável para o nosso dia-a-dia, à Larissa por me aturar toda vez que acabava o TBE e o estoque de gaze da sala de eletroforese, ao Rafael que sempre se dispôs a ajudar, principalmente quando precisávamos transportar algo mais pesado, à Aline por estar sempre disposta a ajudar e muitas vezes fazer mais do que lhe pedi e à Ivana por ser referência nas aulas práticas que participei durante o estágio de docência e me ajudar com PFGE;

Aos professores Josias Rodrigues e Adriano Sakai Okamoto por participarem da minha banca de qualificação e contribuírem com o desenvolvimento deste trabalho;

Às professoras Sandra de Moraes Gimenes Bosco, Terue Sadatsune e ao professor Ary Fernandes Júnior, que sempre me cederam espaço e equipamentos em seus laboratórios;

Ao professor Rodrigo Tavanelli Hernandez que aceitou me co-orientar. Sendo uma grande referência e fonte de inspiração, contribuiu em minha banca de qualificação e sempre me cedeu espaço em seu laboratório. Não fosse o teu conhecimento, este trabalho não teria chego tão longe. Muito obrigado por sanar prontamente minhas dúvidas e me inserir no meio científico no qual você está envolvido;

Aos colegas do laboratório do professor Rodrigo: Melissa e Regiane que sempre se prontificaram para me ajudar com os experimentos e em especial o Rodrigo que, além de me ajudar, me aturou todo dia reclamando de algo diferente;

Às colegas do laboratório da professora Vera, em especial à Fernanda que praticamente me pegou pela mão e me ensinou a fazer quase tudo e à Bruna, Erika e Stéfani. A convivência com vocês foi crucial para que eu me mantivesse na carreira acadêmica. O ambiente que vocês me proporcionaram foi algo que eu jamais imaginaria que seria possível dentro da universidade em meu período de graduação. Muito obrigado pela convivência e pelos ensinamentos;

À minha orientadora Vera Lúcia Mores Rall, que decidiu me acolher como seu aluno mesmo sem termos contato prévio em uma iniciação científica. Seu senso crítico e sua postura como pessoa e como profissional são imensamente admiráveis. Você foi a principal responsável por eu continuar na carreira acadêmica. Muito obrigado pelas oportunidades, sua paciência, ensinamentos e pela motivação que você me proporcionou. Espero no futuro poder lhe mostrar que o seu investimento em meu crescimento não foi em vão.

“Se tocamos Dó e Dó sustenido, pode parecer que tocamos algo errado. Mas ao elevarmos uma oitava do Dó, soa maravilhoso. As mesmas duas notas. Este Dó agora se torna a sétima maior de Dó sustenido, um elemento chave para deixar um acorde maravilhoso. Como pode as mesmas notas soarem ruim em um momento e maravilhoso em outro? Levemos isso para a vida. Quando vemos algo ruim ou horrível na vida, talvez estejamos apenas olhando na oitava errada. Talvez possamos mudar a nossa perspectiva.”

**Victor Wooten**

## 1 RESUMO

2 A mastite bovina é uma inflamação da glândula mamária, geralmente ocasionada  
3 por micro-organismos, que causa grandes prejuízos às fazendas leiteiras, devido ao  
4 uso de medicamentos, pagamento aos médicos veterinários, descarte de leite e até  
5 do animal e a *Escherichia coli* é o principal agente etiológico causador da forma  
6 clínica dessa doença. Neste trabalho, foram pesquisados genes para a classificação  
7 de *E. coli* diarreiogênica (DEC) ou de *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC),  
8 dentro dos grupos filogenéticos, além de genes que codificam fatores de virulência e  
9 resistência aos antimicrobianos. Também foram realizados testes de quantificação  
10 de produção de biofilme e produção de beta-lactamase de espectro estendido  
11 (ESBL). Entre os 161 isolados, dois (1,2%) foram classificados como DEC.  
12 Considerando-se os genes pesquisados, os mais frequentes foram *fimH* (160 =  
13 99,3%), *traT* (126 = 78,3%), *ecpA* (108 = 67%) e *ompT* (60 = 37,3%). Em relação  
14 aos grupos filogenéticos, a maioria foi classificada nos grupos B1 (52,8%) e A  
15 (36,6%). Quanto à produção de biofilme, 68 (42,2%) foram classificadas como não  
16 produtoras, 80 (49,7%) como fracas, 11 (6,8%) como moderadas e apenas duas  
17 (1,2%) foram fortes produtoras. Apenas dois (1,2%) isolados apresentaram  
18 positividade no teste fenotípico de ESBL, com a presença do gene *bla<sub>CTX-M-15</sub>*.  
19 Considerando-se outros genes de resistência, *bla<sub>TEM</sub>* foi encontrado em sete (4,3%)  
20 isolados e *bla<sub>SHV</sub>* em um (0,6%). Os dois (1,2%) isolados *escN+* apresentaram  
21 padrão de aderência “localizado-like” em células HeLa e seu potencial de induzir  
22 lesão *attaching/effacing* foi confirmado através de teste de coloração fluorescente da  
23 actina (FAS). Em relação ao PFGE, foram encontrados 10 clones, envolvendo tanto  
24 animais diferentes quanto o mesmo animal em diferentes períodos de coleta,  
25 indicando manejo inadequado. Não foi possível definir um perfil genético  
26 característico para as *E. coli* patogênicas da glândula mamária (MPECs) e, como  
27 apenas dois isolados apresentaram genes e padrão de adesão característicos de  
28 DEC, parece haver pouco potencial zoonótico para os isolados causadores de  
29 mastite bovina clínica.

30  
31 **Palavras-chave:** grupo filogenético, PFGE, biofilme, KPC.

32

33 **ABSTRACT**

34 Bovine mastitis is an inflammation of the mammary gland, usually caused by  
35 microorganisms, which causes great damage to dairy farms, due to the use of  
36 medicines, payment to veterinarians, disposal of milk and even the animal and  
37 *Escherichia coli* is the main etiologic agent that causes the clinical form of this  
38 disease. In this study, genes were searched for the classification of diarrhogenic *E.*  
39 *coli* (DEC) or extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), within the phylogenetic  
40 groups, in addition to genes that encode virulence factors and resistance to  
41 antimicrobials. Quantification tests of biofilm production and production of extended  
42 spectrum beta-lactamase (ESBL) were also performed. Among the 161 isolates, two  
43 (1.2%) were classified as DEC. Considering the researched genes, the most frequent  
44 were *fimH* (160 = 99.3%), *traT* (126 = 78.3%), *ecpA* (108 = 67%) and *ompT* (60 =  
45 37.3%). Regarding phylogenetic groups, most were classified in groups B1 (52.8%)  
46 and A (36.6%). As for the production of biofilm, 68 (42.2%) were classified as non-  
47 producing, 80 (49.7%) as weak, 11 (6.8%) as moderate and only two (1.2%) were  
48 strong producers. Only two (1.2%) isolates were positive in the ESBL phenotypic  
49 test, with the presence of the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene. Considering other resistance genes,  
50 *bla*<sub>TEM</sub> was found in seven (4.3%) isolates and *bla*<sub>SHV</sub> in one (0.6%). The two (1.2%)  
51 *escN*<sup>+</sup> isolates showed a “localized-like” adhesion pattern in HeLa cells and their  
52 potential to induce attaching/effacing lesion was confirmed through fluorescent actin  
53 staining (FAS) test. Regarding PFGE, 10 clusters were found, involving both different  
54 animals and the same animal in several periods of collection, indicating inadequate  
55 handling. It was not possible to define a characteristic genetic profile for mammary  
56 pathogenic *E. coli* (MPECs) and, as only two isolates had genes and adhesion  
57 pattern characteristic of DEC, there is little zoonotic potential for isolates that cause  
58 clinical bovine mastitis.

59

60 **Keywords:** phylogenetic group, PFGE, biofilm, KPC.

61

## LISTA DE FIGURAS

62		
63		
64	Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genes <i>arpA</i> (400 pb), <i>chuA</i> (288	
65	pb), <i>yjaA</i> (211 pb) e TspE4.C2 (152 pb) para classificação de <i>E. coli</i> isoladas de	
66	leite de vacas com mastite clínica nos grupos filogenéticos. Poço 1: 100 pb DNA	
67	ladder; poço 2: controle positivo <i>E. coli</i> 042; poço 3: controle positivo <i>E. coli</i>	
68	E2348/69; poço 4: branco; poços 5-14: amostras.....	39
69	Figura 2 – ExPEC <i>aaiA</i> <sup>+</sup> / <i>aaiC</i> <sup>+</sup> , sem padrão de adesão definido em células HeLa (A) e <i>E.</i>	
70	<i>coli</i> 042, utilizada como referência de padrão negativo (B).....	42
71	Figura 3 – <i>E. coli</i> C1845 utilizada como referência para o padrão difusamente aderente em	
72	células HeLa (A) e <i>E. coli</i> E2348/69 utilizada como referência para o padrão	
73	localizado (B).....	42
74	Figura 4 – <i>E. coli</i> JPN15 utilizada como referência para padrão “Localizada-like” em células	
75	HeLa (A) e amostra portadora do gene <i>escN</i> apresentando o padrão “Localizado-	
76	like” (B).....	43
77	Figura 5 – Teste de FAS corado com DAPI (evidencia DNA rico em adenina-timina é corado	
78	pela molécula de DAPI evidenciando o sítio de adesão das células bacterianas).	
79	Figuras (A) <i>E. coli</i> 042, controle negativo, que apresenta padrão de adesão	
80	agregativo, sem acúmulo de actina no sítio de adesão; (B) <i>E. coli</i> E2348/69,	
81	controle positivo, que exhibe padrão de adesão localizado e, por ser uma <i>E. coli</i>	
82	enteropatogênica, acumula actina no sítio de adesão; (C) e (D) correspondem a	
83	dois isolados de <i>E. coli</i> <i>escN</i> <sup>+</sup> .....	44
84	Figura 6 – Teste de FAS corado com faloidina (evidencia actina acumulada no sítio de	
85	adesão). Figuras (A) <i>E. coli</i> 042, controle negativo; (B) <i>E. coli</i> E2348/69, controle	
86	positivo; (C) e (D) correspondem a dois isolados de <i>E. coli</i> <i>escN</i> <sup>+</sup> .....	44
87	Figura 7 – Antibiograma de <i>Escherichia coli</i> com cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima,	
88	aztreonam e amoxicilina + ácido clavulânico para verificação de produção de	
89	ESBL. Em (A), há a ilustração de um isolado resistente e em (B), um isolado	
90	sensível. Em (C) está o resultado do teste confirmatório de produção de ESBL	
91	considerados positivos devido à presença de distorção dos halos – “zona	
92	fantasma”.....	45
93	Figura 8 – Produção de biofilme por isolados de <i>E. coli</i> , causadores de mastite clínica	
94	bovina, considerando-se os grupos filogenéticos.....	46

**LISTA DE TABELAS**

95	
96	
97	Tabela 1 – Genes de virulência e sequências dos iniciadores empregados nas reações de PCR
98	para a pesquisa de fatores de virulência em <i>E. coli</i> diarreiogênicas.....29
99	Tabela 2 – Genes de virulência e sequências dos iniciadores usados na pesquisa de fatores de
100	virulência em <i>E. coli</i> extraintestinal (ExPEC).....30
101	Tabela 3 – Tipos de antimicrobianos, suas concentrações e diâmetro dos halos utilizados
102	como referência para verificação de resistência de <i>E. coli</i> produtoras de ESBL
103	segundo CLSI 2015.....36
104	Tabela 4 – Sequência de iniciadores utilizados na pesquisa de ESBL.....37
105	Tabela 5 – Distribuição dos genes que codificam fatores de virulência em 161 isolados de
106	ExPEC obtidos a partir de leite de vacas com mastite clínica, considerando-se os
107	grupos filogenéticos.....41
108	

## SUMÁRIO

109		
110		
111	<b>1. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
112	1.1. Mastite bovina.....	12
113	1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	13
114	1.2.1. <i>E.coli</i> diarreio gênica.....	14
115	1.2.1.1. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	14
116	1.2.1.2. <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina de Shiga (STEC).....	15
117	1.2.1.3. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	15
118	1.2.1.4. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora (EIEC).....	16
119	1.2.1.5. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	16
120	1.2.1.6. <i>Escherichia coli</i> difusamente aderente (DAEC).....	17
121	1.2.2. <i>Escherichia coli</i> patogênica extra-intestinal (ExPEC).....	17
122	1.2.3. Grupos filogenéticos.....	19
123	1.3. Resistência aos antimicrobianos.....	20
124	1.3. 1. Resistência aos $\beta$ -lactâmicos.....	21
125	1.3.2. Resistência à colistina.....	23
126	1.4. Produção de biofilme.....	24
127	<b>2. OBJETIVO</b> .....	26
128	<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
129	3.1. Propriedades e coletas das amostras de leite.....	27
130	3.2. Isolamento e identificação de <i>E. coli</i> .....	28
131	3.3. Caracterização molecular dos isolados de <i>E. coli</i> .....	28
132	3.3.1. Extração do DNA.....	28
133	3.3.2. Identificação de genes associados à patogenicidade.....	28
134	3.3.3. Identificação de grupo filogenético.....	32
135	3.3.4. Pulsed-Field Gel Electrophoresis.....	32
136	3.4. Teste de adesão.....	33
137	3.5. Resistência aos $\beta$ -lactâmicos.....	35
138	3.6. Pesquisa de genes de resistência.....	36
139	3.7. Produção de biofilme.....	37
140	<b>4. RESULTADOS</b> .....	39
141	4.1. Caracterização molecular dos isolados de <i>Escherichia coli</i> .....	39
142	4.2.1 Teste de adesão.....	42
143	4.2.2 Teste de FAS.....	43
144	4.3.1 Resistência aos $\beta$ -lactâmicos.....	45

145	4.3.2 Pesquisa de genes de resistência.....	46
146	4.4. Produção de biofilme.....	46
147	<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	47
148	<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	53
149	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	54
150	<b>ANEXO 1</b> .....	69

## 151 1. REVISÃO DE LITERATURA

152

### 153 1.1. Mastite bovina

154

155 A mastite bovina é uma inflamação das glândulas mamárias, geralmente  
156 ocasionada por micro-organismos, sendo a doença de maior impacto na pecuária leiteira  
157 e causando grandes prejuízos em todo o mundo (DOWN et al., 2017). Estes custos  
158 ocorrem principalmente por tratamentos com antimicrobianos e veterinários, perda de  
159 produção de leite, pelo descarte e diminuição do seu valor, além do abate de casos  
160 crônicos, para evitar a dispersão do patógeno no rebanho. O tratamento com  
161 antimicrobianos pode tratar a infecção, mas a glândula mamária pode levar um longo  
162 tempo para se recuperar totalmente. Ou seja, além dos custos com a infecção e perda de  
163 produção, há ainda o custo dos tratamentos pós-infecção (BLUM et al., 2014).

164 A mastite pode ser classificada em aguda ou crônica, de acordo com sua  
165 duração. Os patógenos relacionados à mastite são classificados em contagiosos  
166 (*Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*) ou ambientais, como a *Escherichia*  
167 *coli* (RUEGG, 2012; OLIVEIRA et al., 2015; TOMAZI et al., 2018). Quanto aos  
168 sintomas, pode ser classificada em clínica, pelo desenvolvimento de sintomas ou  
169 subclínica. No primeiro tipo, dependendo da severidade do caso, os sintomas vão desde  
170 apenas mudanças na constituição do leite, apresentando flocos, coágulos e mudanças na  
171 cor e consistência, até a manifestação de sintomas no animal, como mudanças na  
172 temperatura, taxa de ruminação, apetite, hidratação e comportamento (ADKINS e  
173 MIDDLETON, 2018). O diagnóstico final é dado pela cultura positiva, a partir de uma  
174 amostra do leite (DUNN, 1994). Em campo, o teste mais prático é o da caneca telada de  
175 fundo preto, no qual os três primeiros jatos da ordenha são liberados na caneca,  
176 permitindo a visualização de grumos no leite devido ao contraste com o fundo escuro.  
177 Este método deve ser realizado antes de cada ordenha (EMBRAPA, 2002).

178 Na mastite subclínica, apesar do animal não apresentar mudanças visíveis que  
179 indiquem a presença da doença, há alterações na contagem de células somáticas  
180 (BRADLEY, 2002). Na ausência de infecção, os leucócitos compõem 80% das células  
181 somáticas do quarto e em um quarto infectado, compõem 99%. Além disso, pode-se  
182 notar a diminuição de lactose, a presença de enzimas como lactato desidrogenase e  
183 aumento da condutividade elétrica do leite (ADKINS e MIDDLETON, 2018). A forma  
184 aguda da doença está normalmente associada aos casos clínicos. O desenvolvimento da

185 doença é multifatorial e está relacionado com clima, higiene do ambiente, características  
186 intrínsecas da espécie causadora da infecção e da vaca como raça, paridade e meses em  
187 lactação (OLIVEIRA et al., 2015).

188

## 189 **1.2. *Escherichia coli***

190

191 Inicialmente, essa bactéria foi classificada como *Bacterium coli commune* por  
192 Theodor Escherich (ESCHERICH, 1988). O nome *Escherichia coli* só passou a ser  
193 empregado definitivamente a partir de uma publicação no International Bulletin of  
194 Bacteriological Nomenclature and Taxonomy (COWAN, 1954).

195 *E. coli* é um bacilo Gram-negativo, oxidase-negativa, pertencente à família  
196 Enterobacteriaceae. É capaz de crescer em ambientes aeróbicos e anaeróbicos, com  
197 temperatura ótima de crescimento a 37°C, sendo um micro-organismo mesófilo. Pode  
198 apresentar motilidade por flagelos peritríqueos ou serem imóveis (CROXEN et al.,  
199 2013).

200 Kauffmann propôs a padronização da classificação dos isolados de *E. coli* a  
201 partir de características sorológicas pelos antígenos somático O, flagelar H e capsular K.  
202 Isso se mostrou útil na década de 40, quando foi observado que vários isolados  
203 associados a casos de gastroenterites possuíam o mesmo tipo de antígeno O  
204 (KAUFFMANN, 1947). Alguns isolados não são tipáveis pelo esquema proposto por  
205 Kauffmann, levando à necessidade do uso de metodologias alternativas como o Pulsed-  
206 field Gel Electrophoresis (PFGE), permitindo identificar clones de um mesmo local ou  
207 o Multilocus Sequence Typing (MLST), que permite identificar similaridades entre  
208 isolados de todo o mundo (CROXEN et al., 2013).

209 O tamanho dos genomas de *E. coli* podem diferir em um milhão de pares de  
210 bases entre isolados comensais e patogênicas, devido à presença dos genes de  
211 virulência. Em dados de genômica comparativa, os de *E. coli* são divididos em um  
212 conjunto de genes conservados (housekeeping), chamado de genoma *core* e um *pool*  
213 genético flexível, que pode se deslocar entre as bactérias através de mecanismos como a  
214 conjugação, transformação e transdução, codificada por elementos genéticos móveis,  
215 resultando em transferência horizontal de genes. Elementos genéticos móveis como  
216 transposons, bacteriófagos podem estar integrados ao cromossomo ou em plasmídeos,  
217 que se auto-replicam.

218 *E. coli* pode apresentar diversos genes de virulência que codificam adesinas  
219 (fixação à célula hospedeira), invasinas (invasão à célula hospedeira), sideróforos  
220 (aquisição de moléculas de ferro) e proteínas de membrana que auxiliam na evasão do  
221 sistema imune do hospedeiro. Os fatores de virulência mais característicos encontrados  
222 em *E. coli* patogênicas são derivados de elementos genéticos móveis (CROXEN et al.,  
223 2013).

224

### 225 1.2.1. *E.coli* diarreiogênica

226 A *E. coli* diarreiogênica (DEC) pode ser dividida em diferentes grupos,  
227 baseados em fatores de virulência e padrões de aderência.

228

#### 229 1.2.1.1. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

230 Foi o primeiro grupo de DEC a ser identificado e agrupam bactérias conhecidas  
231 por causar lesão *attaching and effacing* (A/E) devido à sua habilidade de formar lesões  
232 distintas nas superfícies de células intestinais epiteliais. O termo enteropatogênica  
233 referido à *E. coli* foi utilizado pela primeira vez em 1955 (NETER et al., 1955) e,  
234 originalmente, o grupo era definido por sorotipo e não por características patogênicas  
235 como atualmente (CROXEN et al., 2013).

236 As EPECs podem ser classificadas em típicas (tEPEC) ou atípicas (aEPEC),  
237 baseando-se na presença ou ausência do plasmídeo, pEAF (EPEC adherence factor),  
238 respectivamente (TRABULSI et al., 2002). A habilidade de causar a lesão A/E está  
239 relacionada a um *locus* genético chamado de região LEE (Locus of Enterocyte  
240 Effacement). McDaniel e colaboradores (1995) demonstraram que a região LEE de *E.*  
241 *coli* é altamente conservada e consistente com a região LEE de *Hafnia alvei* e  
242 *Citrobacter freundii*, sugerindo que em algum momento da evolução destes micro-  
243 organismos, a região LEE foi transferida horizontalmente.

244 Embora não seja essencial para a formação de lesões A/E, o plasmídeo EAF  
245 aumenta a eficiência, provavelmente devido à presença de um cluster de genes  
246 reguladores (*perA*, *perB* e *perC*) (GÓMEZ-DUARTE e KAPER, 1995). Em tEPEC, a  
247 fímbria BFP é responsável pelo estabelecimento do padrão de adesão localizada  
248 (AL), caracterizado por grupos compactos de bactérias na superfície celular de  
249 culturas de células epiteliais (DONNENBERG et al., 1992). As aEPEC não possuem o  
250 plasmídeo EAF, exibindo um padrão chamado de adesão localizada-like (AL-L)  
251 (RODRIGUES et al., 1996), ou os padrões de aderência difusa (AD), agregativa (AA)

252 ou AL após seis horas de interação com células epiteliais (ABE et al., 2009;  
253 HERNANDES et al., 2009).

254

#### 255 1.2.1.2. *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC)

256 As STECs são definidas como qualquer isolado de *E. coli* que produza a toxina  
257 de Shiga (Stx), pela presença dos genes *stx*<sub>1</sub> e/ou *stx*<sub>2</sub>. A toxina Stx possui uma sub-  
258 unidade A (ativa) que cliva o RNA ribossomal, impedindo a síntese proteica e cinco  
259 subunidades B (ligação) que são responsáveis por ligar a toxina ao glicolípido  
260 globotriaosilceramida (Gb3) na superfície da célula alvo.

261 A Stx é produzida no cólon e alcança o rim através da corrente sanguínea, onde  
262 causa danos às células endoteliais e oclusões na microvasculatura por uma combinação  
263 de toxicidade direta e indução de produção local de citocinas e quimiocinas, levando à  
264 inflamação renal, podendo causar a síndrome hemolítica urêmica, que é caracterizada  
265 por anemia hemolítica, trombocitopenia e possibilidade de falha aguda renal fatal. Além  
266 disso, a toxina pode induzir apoptose em células intestinais epiteliais (KAPER et al.,  
267 2004).

268 Dentro do grupo de STEC, os que apresentam a região LEE são denominados  
269 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) e, assim como as EPECs, podem causar a  
270 lesão A/E (CROXEN et al., 2013).

271

#### 272 1.2.1.3. *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

273 Os primeiros relatos de ETEC surgiram a partir de pacientes com sintomas  
274 característicos aos de cólera. Após tentativas de isolar *Vibrio cholerae* das fezes de  
275 pacientes, que apresentavam culturas puras de *E. coli*, foram feitos testes em coelhos,  
276 confirmado este novo patotipo (DE et al., 1956).

277 ETEC é definida por isolados de *E. coli* que possuam a enterotoxinas  
278 termolábil (LT) ou a termoestável (ST). A LT é semelhante fisiologicamente,  
279 estruturalmente (uma sub-unidade ativa “A” envolvida por cinco sub-unidades de  
280 ligação “B”) e antígenicamente à toxina de cólera e possui mecanismo de ação similar.  
281 Após a colonização do intestino delgado, a ETEC libera a LT, fazendo com que as sub-  
282 unidades LTB se liguem irreversivelmente ao gangliosídeo GM1 e a sub-unidade A  
283 ativa a enzima adenilato-ciclase, que resulta no aumento de AMP cíclico, o que estimula  
284 a secreção de cloreto (carga negativa) nas células crípticas e inibe a absorção de sódio,

285 com o aumento da pressão osmótica na luz intestinal e a consequente diarreia (GILL e  
286 RICHARDSON, 1980; QADRI et al., 2005).

287 A ST é um grupo de toxinas que contém múltiplos resíduos de cisteína, cujas  
288 ligações dissulfeto induzem a termo-estabilidade destas toxinas. A STa se liga à uma  
289 enzima na membrana das células intestinais epiteliais e provoca estímulos para secreção  
290 de cloreto e/ou inibição da absorção de cloreto de sódio, resultando em secreção de  
291 líquido intestinal. A STb induz danos histológicos no epitélio intestinal, levando à perda  
292 de células epiteliais com vilosidades e atrofia parcial das vilosidades (NATARO e  
293 KAPER, 1998).

294

295 *1.2.1.4. Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC):

296 Os isolados de EIEC são bioquimicamente e patogeneticamente relacionadas  
297 com *Shigella* spp. Normalmente são lisina-descarboxilase negativa, sem motilidade e  
298 lactose negativa. No mecanismo de invasão das EIEC, ocorre a penetração em células  
299 epiteliais, lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimentação pelo  
300 citoplasma e extensão para células epiteliais adjacentes. Os genes necessários para  
301 invasão estão em um plasmídeo denominado *pInv*, presente em EIEC e alguns sorotipos  
302 de *Shigella* spp. A infecção por EIEC e *Shigella* costuma estar ligada à ingestão de  
303 alimentos ou água contaminados. Como sintoma principal, normalmente manifesta  
304 disenteria (NATARO & KAPER, 1998).

305

306 *1.2.1.5. Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC):

307 As EAECs são definidas como *Escherichia coli* que não secretam as  
308 enterotoxinas LT ou ST e aderem às células HEp-2 em padrão agregativo, com  
309 morfologia de “tijolos empilhados” (KAPER et al., 2004). É dividida entre EAEC típica  
310 ou atípica, de acordo com a presença ou ausência respectivamente, do gene *aggR*, que  
311 atua como regulador para diversos fatores de virulência responsáveis pela aderência e  
312 produção de toxinas (CROXEN et al., 2013).

313 As EAECs colonizam a mucosa intestinal e passam a secretar enterotoxinas e  
314 citotoxinas, seguida de grande deposição de muco e formação de biofilme envolvendo  
315 as bactérias agregadas. Por fim, há produção de mais citotoxinas que causam danos às  
316 células intestinais (NATARO e KAPER, 1998).

317

318

319 1.2.1.6. *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC):

320 As DAECs são *E. coli* que aderem de maneira difusa às células e superfícies,  
321 ou seja, não se encaixam nos padrões clássicos de aderência como aderência localizada  
322 ou A/E. Podem carregar as adesinas Afa/Dr que, em conjunto com a adesina F1854, se  
323 ligam ao fator acelerador de decaimento (DAF), uma molécula altamente expressa na  
324 superfície apical de células epiteliais polarizadas responsável por regular o sistema  
325 complemento. Após a ligação, o rearranjo do citoesqueleto é induzido, destruindo ou  
326 rearranjando parcialmente as microvilosidades (CROXEN et al., 2013).

327

328 1.2.2. *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC):

329 Além das *E. coli* que causam diarreia, há ainda um grupo que é capaz de causar  
330 infecções em outros órgãos, fora do intestino. São denominadas ExPECs, podendo  
331 causar desde infecção do trato urinário (Uropathogenic *Escherichia coli* - UPEC) até  
332 meningite neonatal (Neonatal meningitis *Escherichia coli* - NMEC) (PITOUT, 2012).

333 Não existe um modelo clonal ou fatores de virulência específicos que definam  
334 essa categoria, pois as que causam infecção extraintestinal possuem alta diversidade  
335 genética entre seus de fatores de virulência, podendo infectar diferentes sítios de  
336 diferentes hospedeiros, demonstrando que existem múltiplas estratégias de  
337 estabelecimento (RUSSO e JOHNSON, 2000).

338 Dentro da categoria de ExPEC, a *E. coli* responsável por causar a mastite foi  
339 denominada MPEC. Blum e Leitner (2013) observaram que, apesar de MPECs serem  
340 parcialmente clonais, não são completamente uniformes geneticamente. Além disso, sua  
341 distribuição genotípica foi diferente da população de *E. coli* residentes no ambiente de  
342 fazendas leiteiras, sugerindo que há seleção de isolados capazes de causar a infecção.

343 A *E. coli* possui relevância na mastite clínica devido a sua capacidade de  
344 causar quadros superagudos e, em raras situações, até letais da doença. Os resultados da  
345 infecção dependem de particularidades do isolado causador e do hospedeiro. A *E. coli*  
346 ambiental pode se adaptar ao meio intra-mamário, por observações da capacidade da  
347 bactéria invadir células mamárias por uma via endocítica, que evita a degradação  
348 lisossomal, evadindo do sistema imune e promovendo persistência na glândula mamária  
349 (PASSEY et al., 2008).

350 As principais fontes de infecção por *E. coli* ambiental são a contaminação fecal  
351 por práticas sanitárias inadequadas durante a ordenha (ATALHI e HASSAN, 2009;  
352 OMBARAK et al., 2016), a manutenção das vacas em local com fezes, pois o orifício

353 do teto permanece aberto por um tempo após a ordenha e entra em contato com essa  
354 contaminação (GYLES e FAIRBROTHER, 2010) e a idade do animal, já que vacas  
355 mais velhas tendem a demorar mais para fechar o esfíncter da glândula mamária.

356 Surto de *E. coli* provenientes de leite e seus derivados, incluindo leite  
357 pasteurizado, já foram registrados em diversos países (DE BUYSER et al., 2001). O  
358 leite não-pasteurizado pode ser um veículo para a bactéria e é consumido por produtores  
359 de leites e suas famílias, além de famílias rurais. Também pode ser consumido de  
360 maneira indireta, devido à fabricação de queijos utilizando este leite (OLIVER et al.,  
361 2005). Outro fator que pode levar a uma cascata de contaminação é a capacidade que  
362 alguns isolados possuem de formar biofilmes, dependendo da superfície em que aderem  
363 e de outros fatores ambientais (WANG et al., 2012).

364 Além disso, por questões culturais, muitas pessoas preferem consumir o leite  
365 cru e seus derivados, pois acreditam que o mesmo possui vantagens nutricionais ou  
366 oferecem algum benefício em comparação e esses produtos pasteurizados, o que acaba  
367 se tornando um problema de saúde pública, visto que o leite contaminado não  
368 pasteurizado e não inspecionado pode carrear resíduos de antimicrobianos e atua como  
369 vetor não apenas de patógenos, mas também de suas toxinas (ATALHI e HASSAN,  
370 2009; RIBEIRO et al., 2009).

371 Para causar a mastite, a primeira barreira a ser superada pela *E. coli* é o canal  
372 do teto. Durante o período seco, o epitélio estratificado do canal forma uma espécie de  
373 plugue de queratina. Além da queratina fechar o canal, ela atua se ligando e  
374 imobilizando diversas bactérias não-encapsuladas causadoras de mastite (RAINARD e  
375 RIOLLET, 2006). Após entrar no canal, a bactéria precisa aderir ao epitélio para não ser  
376 eliminada no processo de ordenha. Estima-se que apenas 50 unidades formadoras de  
377 colônias já sejam capazes de desencadear a doença (SHPIGEL et al., 2008).

378 Fora do período de lactação, o organismo apresenta um sistema de defesa  
379 imune capaz para eliminar a bactéria antes que a mesma provoque alguma doença,  
380 como a alta concentração de lactoferrina no sangue, que captura os íons livres de ferro,  
381 impedindo que a bactéria os absorva. Já no período periparturiente, as vacas ficam em  
382 estado de imunossupressão e apresentam concentração relativamente baixa de  
383 lactoferrina (GYLES e FAIRBROTHER, 2010).

384 Vários estudos tentaram caracterizar genes de virulência de *E. coli* causadora  
385 de mastite bovina em diferentes países (GHANBARPOUR e OSWALD, 2010);

386 SUOJALA et al. 2011; LIU et al., 2014; KEANE, 2016) mas ainda não foi encontrado  
387 um perfil genético que possa classificar apropriadamente estes isolados.

388

### 389 **1.2.3. Grupos filogenéticos**

390

391 A classificação filogenética é uma outra maneira de agrupar as *E. coli*, sendo  
392 inicialmente feita por eletroforese de enzima multilocus ou por tipagem do ribossomo.  
393 Porém, estes métodos são complexos, laboriosos e demandam muito tempo. Clermont e  
394 colaboradores (2000) propuseram a tipagem filogenética através de um PCR triplex,  
395 permitindo a classificação dos principais grupos conhecidos até então: A, B1, B2 e D,  
396 sendo que o grupo A comportava a maior parte das *E. coli* comensais e o B2, os  
397 isolados causadores de infecções extra-intestinais. O PCR triplex era feito com os genes  
398 *chuA* (transportador de ferro em EHEC O157:H7), *yjaA* (encontrado a partir do  
399 sequenciamento completo da *E. coli* K-12, porém ainda sem função definida) e o  
400 fragmento TspE4.C2, obtido durante a criação de biblioteca de DNA em um estudo  
401 anterior.

402 Em 2008, Gordon e colaboradores definiram a função do fragmento TspE4.C2  
403 como sendo um gene de esterase lipase putativo com tamanho variando entre 909, 921 e  
404 984 pb de acordo com o isolado e testaram a confiabilidade do método de PCR triplex  
405 comparando com resultados de MLST e observaram que, apesar do método acertar 95%  
406 das vezes nos casos de grupos B1 e B2, era necessário analisar mais um gene para  
407 aumentar a precisão do teste (GORDON et al., 2008).

408 Walk e colaboradores (2009) demonstraram diferentes linhagens do gênero  
409 *Escherichia* que eram fenotipicamente indistinguíveis, mas geneticamente distintas de  
410 *E. coli*, dando origem aos clados crípticos de I a V. Considerando os grupos  
411 reconhecidos até então e o clado críptico mais próximo (clado I), Clermont e  
412 colaboradores (2013) propuseram a introdução do gene *arpA*, tornando o PCR  
413 quadruplex. A presença do gene *arpA* teria dois propósitos. Primeiramente como  
414 controle de qualidade do DNA, já que com sua adição, todas as *E. coli* e clado I  
415 passariam a apresentar pelo menos uma banda no gel. Além disso, permitiria a distinção  
416 de isolados pertencentes ao filogrupo F, que antes era erroneamente identificado como  
417 grupo D (*chuA+*, *yjaA-*, TspE4.C2-), já que esse gene está presente em todas as *E. coli*  
418 exceto nas pertencentes aos filogrupos B2 e F. Neste mesmo trabalho, foram  
419 apresentados primers para identificação dos grupos C (*trpAgpC+*, *trpBA+*), que poderia

420 apresentar perfil semelhante ao grupo A (*trpAGP*<sup>-</sup>, *trpBA*<sup>+</sup>) e E (*arpAgpE*<sup>+</sup>, *trpBA*<sup>+</sup>),  
421 que poderia apresentar perfil semelhante ao grupo D (*arpAgpE*<sup>-</sup>, *trpBA*<sup>+</sup>). A partir deste  
422 novo método, foi realizada nova comparação com a tipagem por MLST e confirmado o  
423 aumento da precisão deste teste.

424 Em 2019, foi caracterizado o grupo G, que se encaixa entre os grupos B2 e F e  
425 é raramente isolado de humanos, porém frequentemente encontrados na pecuária,  
426 especialmente em ambientes de avicultura. Isolados deste grupo apresentam extensa  
427 resistência aos antimicrobianos e um método de rápida identificação do grupo G por  
428 PCR já foi proposto (CLERMONT et al., 2019).

429

### 430 **1.3. Resistência aos antimicrobianos:**

431

432 Antibióticos são utilizados frequentemente para controlar a mastite, mas seu  
433 uso inadequado pode levar ao aumento de resistência, ocasionando futuras falhas de  
434 tratamento, sendo importante avaliar essa resistência em nível fenotípico e genotípico.  
435 Cada vez mais, a resistência bacteriana está se tornando um problema mundial,  
436 requerendo esforços no estudo e análise dos genes de resistência entre patógenos  
437 (FAZEL et al., 2019).

438 Os genes de resistência às drogas estão ligados, geralmente, a elementos  
439 móveis como bacteriófagos, plasmídeos e transposons, ou seja, podem ser transferidos  
440 entre bactérias de diferentes grupos taxonômicos. Estes genes normalmente estão  
441 relacionados a um único tipo ou família de antibióticos, porém vários genes  
442 relacionados a diferentes drogas podem estar presentes no mesmo micro-organismo.  
443 Além deste mecanismo, mutações sequenciais no cromossomo podem levar ao  
444 surgimento de resistências de alto nível. *E. coli* e outras espécies da família  
445 Enterobacteriaceae vem adquirindo resistência à fluoroquinolonas devido às mutações na  
446 topoisomerase (alvo deste antimicrobiano) e pelo aumento da expressão de proteínas de  
447 membrana que bombeiam a droga para fora da célula (LEVY e MARSHALL, 2004).

448 O uso prolongado de um único antimicrobiano, ou seja, por mais de 10 dias,  
449 pode selecionar bactérias resistentes a este antibiótico e a outros estruturalmente  
450 semelhantes, através de resistência cruzada. A partir disto, a microbiota que está sendo  
451 atacada pelos antimicrobianos pode ser colonizada por organismos resistentes. Apesar  
452 da obtenção de resistência ser rápida, sua perda é exponencialmente lenta (LEVY e  
453 MARSHALL, 2004). Em um estudo conduzido na Finlândia, ao notar o alarmante

454 crescimento de resistência aos macrolídeos (principalmente eritromicina) por parte de  
455 *Streptococcus pyogenes* isolados de pacientes com infecção cutânea e respiratória, foi  
456 instruído a redução do uso desta categoria de antimicrobianos. Após 4 anos, o número  
457 de isolados resistentes passou de 15,6% a 8,6% (SEPÄLÄ et al., 1997).

458 Em rebanhos com manejo intenso, vários casos de mastite clínica são cultura-  
459 negativo ou causados por patógenos com altas taxas de cura espontânea. Nestes locais,  
460 muitos antimicrobianos são administrados desnecessariamente, pela falta de  
461 conhecimento do proprietário. Tal comportamento pode permitir seleção de patógenos  
462 oportunistas que ainda não tiveram a oportunidade de adentrar a glândula mamária das  
463 vacas, tornando os tratamentos futuros mais complexos e caros (RUEGG, 2018).

464 Porém, nos casos de mastite clínica, a antibioticoterapia é necessária e nestes  
465 casos, os  $\beta$ -lactâmicos (ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, cefalotina, cefoperazona,  
466 ceftiofur e penicilina G) são os antibióticos de preferência, seguidos pelas tetraciclina  
467 (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina) e pelos aminoglicosídeos (estreptomicina,  
468 neomicina e gentamicina) (SANTOS, 2013).

469

#### 470 1.3.1. Resistência aos $\beta$ -lactâmicos:

471 Os  $\beta$ -lactâmicos são antimicrobianos que atuam impedindo a síntese da parede  
472 celular bacteriana. De acordo com a estrutura do anel  $\beta$ -lactâmico, são classificados em  
473 penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e  
474 inibidores de  $\beta$ -lactamases (FINCH et al., 2012), que são as enzimas responsáveis por  
475 quebrar os  $\beta$ -lactâmicos. A hidrólise de  $\beta$ -lactâmicos por  $\beta$ -lactamases é o mecanismo  
476 mais comum de resistência para essa classe de antimicrobianos em Gram-negativas de  
477 importância clínica. Em 2009, o número de sequências proteicas únicas ultrapassava  
478 890 (BUSH e JACOBY, 2010).

479

#### 480 ***$\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL)***

481 Além das  $\beta$ -lactamases convencionais, há ainda as de amplo espectro (ESBL),  
482 que são enzimas originalmente derivadas ou evoluídas de algum ancestral de espectro  
483 estreito e adquiriram a capacidade de inativar um amplo espectro de cefalosporinas,  
484 penicilinas e aztreonam, mas não cefamicinas ou carbapenêmicos por atividade  
485 hidrolítica, sendo inibidos por inibidores de  $\beta$ -lactamases como o ácido clavulânico  
486 (RAHMAN et al., 2018).

487           Dentre os tipos de ESBL já descritas, CTX-M, TEM e SHV são as mais bem-  
488 sucedidas em termos de disseminação e capacidade de interação. Estima-se que a  
489 principal estratégia evolutiva para obtenção dessa resistência por Gram-negativos seja a  
490 variedade de mutantes com especificidade estendida nos tipos já prevalentes de  $\beta$ -  
491 lactâmicos TEM e SHV e a aquisição de genes de  $\beta$ -lactamases de amplo espectro de  
492 genomas existentes no ambiente (RAHMAN et al., 2018).

493           As enzimas CTX-M foram classificadas em cinco grandes grupos: CTX-M-1,  
494 CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25, pelo compartilhamento de, pelo menos,  
495 94 % de identidade nas sequências de aminoácidos (BRADFORD, 2001; BONNET,  
496 2004), conferindo níveis elevados de resistência à cefotaxima e à ceftazidima  
497 (BONNET, 2004). Entretanto, já foram observadas diferenças de resistência entre os  
498 subtipos de CTX-M, como o CTX-M-15, que pertence ao grupo CTX-M-1 e apresenta  
499 atividade catalítica aumentada à ceftazidima (POIREL et al., 2002), em relação aos  
500 outros subtipos do mesmo grupo. Até o momento, foram relatadas 172 variantes de  
501 CTX-M (RAHMAN et al., 2018) com sequência de aminoácidos e características  
502 funcionais distintas, sendo a CTX-M-15 e CTX-M-14, os tipos mais comumente  
503 detectados globalmente, seguidas por CTX-M-2, CTX-M-3 e CTX-M-1 (LEVY, 2002).  
504 Em casos de mastite bovina, as variantes CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-14,  
505 CTX-M-15, CTX-M-32 e CTX-M-55 já foram relatadas (PEHLIVANOGLU et al.,  
506 2016; ALI et al., 2017; EISENBERGER et al., 2018).

507           Em um relatório da Organização Mundial da Saúde de 2014 (WHO, 2014), *E.*  
508 *coli* recebeu atenção especial devido à resistência às cefalosporinas de terceira geração e  
509 fluoroquinolonas. Os genes de ESBL podem dispersar entre isolados bacterianos através  
510 da troca de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, que podem ainda abrigar  
511 outros genes de resistência. A detecção de *E. coli* produtoras de ESBL em amostras de  
512 leite, principalmente em leite cru e seus derivados, demonstraram que o leite pode atuar  
513 como um veículo para a introdução de *E. coli* produtora de ESBL na teia alimentar  
514 (FREITAG et al., 2017).

515

#### 516 ***$\beta$ -lactamases tipo AmpC***

517           As  ***$\beta$ -lactamases ampC*** são capazes de hidrolisar cefalosporinas e cefamicinas,  
518 não sendo inibidas por inibidores de  $\beta$ -lactamases como tazobactam e ácido clavulânico.  
519 Os genes que conferem este tipo de resistência podem ser tanto cromossomais quanto

520 plasmidiais. Até 2016, foram descritas 130  $\beta$ -lactamases do tipo CMY (POWERS,  
521 2016).

522 A expressão de  $\beta$ -lactamase AmpC cromossomal em *E. coli* parece ser baixa  
523 (SIU et al., 2003), mas a variante CMY-2 plasmidial já foi encontrada em isolados de  
524 mastite bovina (ENDIMIANI et al., 2012).

525

### 526 ***Carbapenemases***

527 As carbapenemases impedem a ligação cruzada na síntese do peptoglicano,  
528 fazendo com que a estrutura celular enfraqueça e ocorra lise (CODJOE e DONKOR,  
529 2018). Dentro do grupo de carbapenemases, a KPC (carbapenemase *K. pneumoniae*)  
530 hidrolisa penicilinas, todas as cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos e  
531 inibidores de  $\beta$ -lactamases (PAPP-WALLACE et al., 2010). O primeiro estudo  
532 relatando a presença de KPC foi publicado em 2001 (YIGIT et al., 2001), mostrando  
533 que uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* nos Estados Unidos era resistente à  
534 carbapenêmicos e, desde então, vem sido relatada em outros Gram-negativos e em  
535 outros países (MUNOZ-PRICE et al., 2013). *E. coli* portando o gene *bla<sub>kpc</sub>* já foram  
536 encontradas em fezes de gado de corte, que não haviam sido expostos à antibióticos  
537 (VIKRAM e SCHMIDT, 2018), indicando possível risco à saúde pública.

538 A New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase 1 (NDM-1) também foi encontrada pela  
539 primeira vez em um isolado de *K. pneumoniae*, em 2009, a partir de um paciente com  
540 infecção urinária. O gene que confere essa resistência também foi observado em um  
541 isolado de *E. coli*, a partir de fezes do mesmo paciente, levantando-se a hipótese da  
542 ocorrência de *conjugação in vivo* (YONG et al., 2009). Estima-se que a partir de então, o  
543 gene de NDM-1 foi transmitido por bactérias ao redor do mundo devido ao trânsito de  
544 turistas entre diferentes países (CODJOE e DONKOR, 2018), já sendo encontrada em  
545 isolados de *E. coli* causadora de mastite. Isto é um problema pois pode haver introdução  
546 de bactérias portadoras do gene de NDM-1 na teia alimentar a partir do leite (GHATAK  
547 et al., 2013). Dezesesseis variantes de NDM já foram descritas (YAICI et al., 2016), sendo a  
548 NDM-1 a mais prevalente em caso de mastite bovina (GHATAK et al., 2013).

549

### 550 1.3.2. Resistência à colistina

551 A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos tornou necessário o uso de antibióticos mais  
552 tóxicos, como a colistina (polimixina E). Seu mecanismo de ação é translocar estruturas  
553 presentes na parede de bactérias Gram-negativas, levando à ruptura da membrana

554 (NEWTON, 1956). Apesar de ser muito utilizada na medicina veterinária, a colistina  
555 não costuma ser usada no tratamento de humanos por ser altamente nefro e neurotóxica  
556 (CATRY et al., 2015).

557 Até 2015, o gene responsável por conferir resistência à colistina, o *mcr-1*,  
558 estava exclusivamente associado ao cromossomo, mas Liu e colaboradores (2016)  
559 demonstraram a presença de um plasmídeo denominado MCR-1, encontrado em uma *E.*  
560 *coli*, isolada de suíno, albergando esse gene (LIU et al., 2016). Em 2016, o gene  
561 plasmidial *mcr-2*, foi descrito por XAVIER et al. (2016), que observaram homologia de  
562 76,7% nas seqüências de nucleotídeos, quando comparado com *mcr-1*.

563 Em um estudo realizado na China, Liu e colaboradores (2019) encontraram  
564 ocorrência concomitante de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> e *mcr-1* em leite de vacas com mastite clínica.  
565 Recentemente, foi encontrado pela primeira vez *E. coli* multirresistente, produtora de  
566 ESBL e *mcr-1* causando mastite clínica (FILIOUSSIS et al., 2020).

567

#### 568 **1.4. Produção de biofilme**

569

570 Durante o início do desenvolvimento do biofilme, a síntese de flagelos é  
571 reprimida, já que a adesão da bactéria à superfície faz com que a *E. coli* se torne sésil.  
572 Logo após a adesão, as bactérias se agregam a partir de interação célula-a-célula, tendo  
573 início também a produção da matriz extra-celular, tendo-se como os principais  
574 exopolissacarídeos o polímero  $\beta$ -1,6-N-acetil-D-glucosamina, que medeia a adesão  
575 célula-à-célula e às superfícies, além de atuar como adesina para estabilizar o biofilme,  
576 a celulose, que confere rigidez ao biofilme e o ácido colânico, que forma uma cápsula  
577 ao redor do biofilme, protegendo-o do ambiente externo e de antimicrobianos. Sabe-se  
578 que, em *E. coli*, o biofilme pode conferir resistência a ampicilina, cefotaxima,  
579 norfloxacin e ácido nalidíxico, facilitando a ocorrência de infecções persistentes. Após  
580 a maturação, algumas células podem se destacar do biofilme por degradação enzimática,  
581 em resposta a pressões ambientais como níveis nutricionais e colonizar outras regiões  
582 (SHARMA et al., 2016).

583 A mastite bovina é um dos principais problemas na pecuária leiteira do Brasil e  
584 do mundo e a investigação de fatores de virulência, filogenia e resistência aos  
585 antimicrobianos nos isolados de MPEC, contribuirá para uma maior compreensão  
586 desses patógenos, auxiliando no combate desta enfermidade a campo e na prevenção de  
587 possíveis infecções humanas. Além disso, a comparação genotípica desses isolados

588 pode permitir a identificação de grupos clonais diferentes, na procura de marcadores  
589 específicos dessa doença.  
590

1180 **6. CONCLUSÃO**

1181

1182           A maior parte das infecções de mastite clínica bovina foi causada por *E. coli*  
1183 comensal e não foi possível definir marcadores moleculares para o grupo MPEC, devido  
1184 à alta variabilidade genética encontrada. Com exceção de dois isolados, nenhum outro  
1185 apresentou genes nem padrões de adesão que definem os grupos de DEC. Logo, os  
1186 isolados de *E. coli* causadoras de mastite clínica bovina estudados apresentam baixo  
1187 potencial zoonótico.

1188

1189 **REFERÊNCIAS**

- 1190 ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*  
1191 identified by the *eae+* EAF-negative *stx-* genetic profile. **Diagnostic Microbiology and**  
1192 **Infectious Disease**, v. 64, n. 4, p. 357-365, 2009.
- 1193 ACIK, M. N. et al. *traT* and *cnf2* genes of *Escherichia coli* isolated from milk of  
1194 healthy cows and sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 77, n. 1, p. 17-21, 2004.
- 1195 ADKINS, P. R. F; MIDDLETON, J. R. Methods for diagnosing mastitis. **Veterinary**  
1196 **Clinics: Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 479-491, 2018.
- 1197 ALI, T. et al. ESBL-producing *Escherichia coli* from cows suffering mastitis in China  
1198 contain clinical class 1 integrons with CTX-M linked to ISCR1. **Frontiers in**  
1199 **microbiology**, v. 7, p. 1931, 2016.
- 1200 ALI, T. et al. Characteristics and genetic diversity of multi-drug resistant extended-  
1201 spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from bovine  
1202 mastitis. **Oncotarget**, v. 8, n. 52, p. 90144-90163, 2017.
- 1203 ALTALHI, A. D.; HASSAN, S. A. Bacterial quality of raw milk investigated by  
1204 *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. **Food**  
1205 **Control**, v. 20, n. 10, p. 913-917, 2009.
- 1206 ANDRADE, F. B. et al. A sensitive and specific molecular tool for detection of both  
1207 typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological**  
1208 **Methods**, v. 106, p. 16-18, 2014.
- 1209 ARANDA, K. R. S. et al. Single multiplex assay to identify simultaneously  
1210 enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-  
1211 producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiology Letters**,  
1212 v. 267, n. 2, p. 145-150, 2007.
- 1213 BICALHO, R. C. et al. Molecular and epidemiological characterization of bovine  
1214 intrauterine *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5818-5830,  
1215 2010.
- 1216 BLUM, S. E.; LEITNER, G. Genotyping and virulence factors assessment of bovine  
1217 mastitis *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 163, n. 3-4, p. 305-312, 2013.
- 1218 BLUM, S. E.; HELLER, E. D.; LEITNER, G. Long term effects of *Escherichia coli*  
1219 mastitis. **The Veterinary Journal**, v. 201, n. 1, p. 72-77, 2014.

- 1220 BOISEN, N. et al. High prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among  
1221 strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. **The American Journal of Tropical**  
1222 **Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 2, p. 294-301, 2009.
- 1223 BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: The CTX-M  
1224 enzymes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 1-14, 2004.
- 1225 BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century:  
1226 Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat.  
1227 **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 933-951, 2001.
- 1228 BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v.  
1229 164, n. 2, p. 116-128, 2002.
- 1230 BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine  
1231 mammary gland. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1845-1849, 2001.
- 1232 BRENNAN, E. et al. Multidrug-resistant *Escherichia coli* in bovine animals, Europe.  
1233 **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 9, p. 1650, 2016.
- 1234 BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of  $\beta$ -  
1235 lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.
- 1236 CAMPOS, Leila Carvalho et al. Diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC) strains of  
1237 fecal origin rarely express F1845 adhesin. **Microbiology and Immunology**, v. 43, n. 2,  
1238 p. 167-170, 1999.
- 1239 CATRY, B. et al. Use of colistin-containing products within the European Union and  
1240 European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible  
1241 impact on human and animal health. **International Journal of Antimicrobial Agents**,  
1242 v. 46, n. 3, p. 297-306, 2015.
- 1243 CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Standard Operating Procedure for**  
1244 **PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC),**  
1245 ***Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*.** 2017. Disponível em:  
1246 <<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>>.  
1247 Acesso em 08 out. 2019.
- 1248 CLERMONT, O. et al. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli*  
1249 phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555-  
1250 4558, 2000.

- 1251 CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited:  
1252 improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental**  
1253 **Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58-65, 2013.
- 1254 CLERMONT, O. et al. Characterization and rapid identification of phylogroup G in  
1255 *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential.  
1256 **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 3107-3117, 2019.
- 1257 CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for**  
1258 **Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement.**  
1259 **EUA**. 2015. (M100-S25)
- 1260 CODJOE, F. S.; DONKOR, E. S. Carbapenem resistance: a review. **Medical Sciences**,  
1261 v. 6, n. 1, p. 1, 2018.
- 1262 COQUE, T. M. et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains  
1263 expressing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15. **Emerging infectious diseases**,  
1264 v. 14, n. 2, p. 195, 2008.
- 1265 COSTA, J. C. M. et al. Increase in biofilm formation by *Escherichia coli* under  
1266 conditions that mimic the mastitic mammary gland. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 666-  
1267 671, 2014.
- 1268 COWAN, S. T. A review of names for coliform organisms. **International Bulletin of**  
1269 **Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**, v. 4, n. 2, p. 119-124, 1954.
- 1270 CRAVIOTO, A., GROO, R.J., SCOTLAND, S.M., ROWE, B. An adhesive factor  
1271 found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile  
1272 enteropathogenic serotypes. **Current Microbiology**. v.3, n.2, p. 95-99, 1979.
- 1273 CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic  
1274 *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.
- 1275 CZECZULIN, J. R. et al. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely  
1276 adherent *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p. 2692-2699, 1999.
- 1277 DAGA, A. P. et al. *Escherichia coli* bloodstream infections in patients at a University  
1278 Hospital: virulence factors and clinical characteristics. **Frontiers in Cellular and**  
1279 **Infection Microbiology**, v. 9, 2019.

- 1280 DE BUYSER, M. et al. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in  
1281 France and in different industrialized countries. **International Journal of Food**  
1282 **Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 1-17, 2001.
- 1283 DE OLIVEIRA GARCIA, D. et al. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae*  
1284 producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a  
1285 neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.  
1286 52, n. 5, p. 1790-1793, 2008.
- 1287 DE, S. N. et al. A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and  
1288 chronic enteritis. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 71, n. 1, p. 201-209,  
1289 1956.
- 1290 DEZFULIAN, H. et al. Presence and characterization of extraintestinal pathogenic  
1291 *Escherichia coli* virulence genes in F165-positive E. coli strains isolated from diseased  
1292 calves and pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1375-1385, 2003.
- 1293 DOGAN, B. et al. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent  
1294 bovine mastitis. **Veterinary microbiology**, v. 116, n. 4, p. 270-282, 2006.
- 1295 DONNENBERG, M. S. et al. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of  
1296 enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Molecular**  
1297 **Microbiology**, v. 6, n. 22, p. 3427-3437, 1992.
- 1298 DÖPFER, D. et al. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows.  
1299 **Journal of dairy science**, v. 82, n. 1, p. 80-85, 1999.
- 1300 DOWN, P. M. et al. Factors affecting the cost-effectiveness of on-farm culture prior to  
1301 the treatment of clinical mastitis in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v.  
1302 145, p. 91-99, 2017.
- 1303 DUNN, C. Acute coliform mastitis in a dairy cow. **The Canadian Veterinary Journal**,  
1304 v. 35, n. 5, p. 301, 1994.
- 1305 EDELSTEIN, M. et al. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-  
1306 spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in  
1307 Russian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3724-  
1308 3732, 2003.
- 1309 EISENBERGER, D. et al. Molecular Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -  
1310 Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Milk Samples of Dairy Cows with

Código de campo alterado

- 1311 Mastitis in Bavaria, Germany. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 4, p. 505-510,  
1312 2018.
- 1313 EMBRAPA. Controle de Mamite. 2002. Disponível em:  
1314 <[https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/manej](https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/manejo/mamite.html)  
1315 o/mamite.html>. Acesso em: 07 out. 2019.
- 1316 ENDIMIANI, A. et al. *Escherichia coli* producing CMY-2  $\beta$ -lactamase in bovine  
1317 mastitis milk. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 1, p. 137-138, 2012.
- 1318 ESCHERICH, Th. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. **Clinical**  
1319 **Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1220-1225, 1988.
- 1320 EWERS, C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing  
1321 *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical**  
1322 **Microbiology**, v. 297, n. 3, p. 163-176, 2007.
- 1323 FAZEL, F.; JAMSHIDI, A.; KHORAMIAN, B. Phenotypic and genotypic study on  
1324 antimicrobial resistance patterns of *E. coli* isolates from bovine mastitis. **Microbial**  
1325 **Pathogenesis**, v. 132, p. 355-361, 2019.
- 1326 FERNANDES, J. B. C.; ZANARDO, J. G.; GALVÃO, N. N.; CARVALHO, I. A.;  
1327 NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. S. *Escherichia coli* from clinical mastites serotypes  
1328 and virulence factors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 6, p.  
1329 1146-1152, 2011.
- 1330 FERNANDES, S. A. et al. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases CTX-M-8  
1331 and CTX-M-2-producing *Salmonella* serotypes from clinical and nonhuman isolates in  
1332 Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 5, p. 580-589, 2017.
- 1333 FILIOUSSIS, G. et al. Bovine mastitis caused by a multidrug-resistant, mcr-1-positive  
1334 (colistin-resistant), extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* clone on  
1335 a Greek dairy farm. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 1, p. 852-857, 2020.
- 1336 FINCH, R.; DAVEY, P.; WILCOX, M. H.; IRVING, W. **Antimicrobial**  
1337 **Chemotherapy**, Oxford University Press, 2012, p. 137.
- 1338 FREITAG, C. et al. Detection of plasmid-borne extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)  
1339 genes in *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.  
1340 200, p. 151-156, 2017.

- 1341 GHANBARPOUR, R.; OSWALD, E. Phylogenetic distribution of virulence genes in  
1342 *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran. **Research in Veterinary Science**,  
1343 v. 88, n. 1, p. 6-10, 2010.
- 1344 GHATAK, S. et al. Detection of New Delhi metallo-beta-lactamase and extended-  
1345 spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from mastitic milk  
1346 samples. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, n. 5, p. 385-389, 2013.
- 1347 GILL, D. M.; RICHARDSON, S. H. Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate  
1348 cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: comparison with  
1349 cholera toxin. **Journal of Infectious Diseases**, v. 141, n. 1, p. 64-70, 1980.
- 1350 GÓMEZ-DUARTE, O. G.; KAPER, J. B. A plasmid-encoded regulatory region  
1351 activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection**  
1352 **and Immunity**, v. 63, p. 1767-1776, 1995.
- 1353 GORDON, David M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups:  
1354 multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental**  
1355 **Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2484-2496, 2008.
- 1356 GUERRA, S. T. et al. Putative virulence factors of extra-intestinal *Escherichia coli*  
1357 isolated from bovine mastitis with different clinical scores. **Letters in Applied**  
1358 **Microbiology**, v. 68, p. 403-408, 2019.
- 1359 GUNZBURG, S. T.; TORNIÉPORTH, N. G.; RILEY, L. W. Identification of  
1360 enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus  
1361 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1375-1377, 1995.
- 1362 GYLES, C.L., FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: Gyles CL, Prescott JF,  
1363 Thoen CO (Eds.), **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Blackwell  
1364 Publishing, Ames, pp. 267-308, 2010.
- 1365 HEJAIR, H. M. A. et al. Role of outer membrane protein T in pathogenicity of avian  
1366 pathogenic *Escherichia coli*. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 109-116,  
1367 2017.
- 1368 HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia*  
1369 *coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, n. 2, p. 137-149, 2009.

- 1370 HERNANDES, R. T. et al. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic  
1371 *Escherichia coli* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8391-  
1372 8399, 2011.
- 1373 HERNANDES, R. T. et al. Dissection of the role of pili and type 2 and 3 secretion  
1374 systems in adherence and biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia*  
1375 *coli* strain. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3793-3802, 2013.
- 1376 HOGAN, J.; SMITH, K. L. Managing environmental mastitis. **Veterinary Clinics:**  
1377 **Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 217-224, 2012.
- 1378 HUANG, S. et al. *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells in  
1379 vitro and in vivo: molecular cloning and characterization of invasion gene  
1380 *ibe10*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4470-4475, 1995.
- 1381 JOHNSON, J. R. et al. Isolation and Molecular Characterization of Nalidixic Acid-  
1382 Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Retail Chicken Products.  
1383 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2161-2168, 2003.
- 1384 JOHNSON, J. R. et al. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two  
1385 novel putative virulence genes, *iha* and *iroNE*. *coli*, among *Escherichia coli* isolates  
1386 from patients with urosepsis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 3040-3047,  
1387 2000a.
- 1388 JOHNSON, J. R. et al. Evidence of commonality between canine and human  
1389 extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains that express *papG* allele III. **Infection**  
1390 **and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3327-3336, 2000b.
- 1391 JOHNSON, J. R.; STELL, Adam L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli*  
1392 strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **The**  
1393 **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261-272, 2000.
- 1394 KACZMAREK, A. et al. Virulence-associated genes and antibiotic susceptibility  
1395 among vaginal and rectal *Escherichia coli* isolates from healthy pregnant women in  
1396 Poland. **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 5, p. 637-643, 2018.
- 1397 KAPER, J. B. et al. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2,  
1398 n. 2, p. 123, 2004.

- 1399 KASSÉ, F. N. et al. Relationship between *Escherichia coli* virulence factors and  
1400 postpartum metritis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4656-4667,  
1401 2016.
- 1402 KAUFFMANN, F. et al. The serology of the coli group. **Journal of Immunology**, v.  
1403 57, n. 1, p. 71-100, 1947.
- 1404 KEANE, O. M. Genetic diversity, the virulence gene profile and antimicrobial  
1405 resistance of clinical mastitis-associated *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**,  
1406 v. 167, n. 8, p. 678-684, 2016.
- 1407 KILANI, H. et al. Diverse *Escherichia coli* pathovars of phylogroups B2 and D isolated  
1408 from animals in Tunisia. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n.  
1409 07, p. 549-556, 2017.
- 1410 KRUGER, Tersia et al. Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing  
1411 TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. **Antimicrobial Agents  
1412 and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4263-4270, 2004.
- 1413 LE BOUGUENEC, C. et al. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa*  
1414 adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase  
1415 chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 1189-1193, 1992.
- 1416 LEHTI, T. A. et al. Mat fimbriae promote biofilm formation by meningitis-associated  
1417 *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 156, n. 8, p. 2408-2417, 2010.
- 1418 LEVY, S. B. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. **Journal of  
1419 Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 25-30, 2002.
- 1420 LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges  
1421 and responses. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12s, p. S122, 2004.
- 1422 LIASSINE, N. et al. Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin  
1423 resistance in urinary tract Enterobacteriaceae in Switzerland. **International Journal of  
1424 Infectious Diseases**, v. 51, p. 4-5, 2016.
- 1425 LIMA, I. et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-  
1426 related genes in a case-control study among children from north-eastern  
1427 Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. Pt 5, p. 683, 2013.

- 1428 LIU, G. et al. Co-occurrence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance (*mcr-1*) and  
1429 Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Encoding Genes in *Escherichia coli* from Bovine  
1430 Mastitic Milk in China. **Microbial Drug Resistance**, 2019.
- 1431 LIU, Y. et al. Phylogenetic group, virulence factors and antimicrobial resistance of  
1432 *Escherichia coli* associated with bovine mastitis. **Research in Microbiology**. v. 165, p.  
1433 273-277, 2014.
- 1434 LIU, Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in  
1435 animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological  
1436 study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.
- 1437 MCDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among  
1438 diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,  
1439 v. 92, n. 5, p. 1664-1668, 1995.
- 1440 MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C. M.; CURTISS R.; BROWN, P. K.;  
1441 ARNE, P.; BREE, A. ; DESAUTELS, C. ; FAIRBROTHER, J. M. Role of virulence  
1442 factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity.  
1443 **Infection and Immunity**. v. 71, p. 536-540, 2003.
- 1444 MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of  
1445 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p.  
1446 785-796, 2013.
- 1447 NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology**  
1448 **Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- 1449 NETER, E. et al. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli*  
1450 in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, n. 6, p. 801-8, 1955.
- 1451 NEWTON, B. A. The properties and mode of action of the polymyxins. **Bacteriological**  
1452 **Reviews**, v. 20, n. 1, p. 14, 1956.
- 1453 OLIVEIRA, C. S. F. et al. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian  
1454 dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 121, n. 3-4, p. 297-305, 2015.
- 1455 OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk  
1456 and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne**  
1457 **Pathogens and Disease**, v. 2, n. 2, p. 115-129, 2005.

- 1458 OLSON, M. A. et al. Genome-wide identification of fitness factors in mastitis-  
1459 associated *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 84, n. 2, p.  
1460 e02190-17, 2018.
- 1461 OMBARAK, R. A. et al. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli*  
1462 isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **International Journal of Food**  
1463 **Microbiology**, v. 221, p. 69-76, 2016.
- 1464 OHNISHI, M. et al. Genetic characteristics of CTX-M-type extended-spectrum- $\beta$ -  
1465 lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae involved in mastitis cases on Japanese  
1466 dairy farms, 2007 to 2011. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 9, p. 3117-3122,  
1467 2013.
- 1468 ONANUGA, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial  
1469 resistant *Escherichia coli* from urinary tract infections in Port-Harcourt, Nigeria. **Pan**  
1470 **African Medical Journal**, v. 34, n. 144, 2019.
- 1471 PAPP-WALLACE, K. M. et al. Inhibitor resistance in the KPC-2  $\beta$ -lactamase, a  
1472 preeminent property of this class A  $\beta$ -lactamase. **Antimicrobial Agents and**  
1473 **Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 890-897, 2010.
- 1474 PASSEY, S.; BRADLEY, A.; MELLOR, H. *Escherichia coli* isolated from bovine  
1475 mastitis invade mammary cells by a modified endocytic pathway. **Veterinary**  
1476 **Microbiology**, v. 130, n. 1-2, p. 151-164, 2008.
- 1477 PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic  
1478 *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx* 1, *stx* 2, *eaeA*,  
1479 enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb* O111, *andrfb* O157. **Journal of Clinical**  
1480 **Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598-602, 1998a.
- 1481 PEHLIVANOGLU, F. et al. CTX-M-15-Type Extended-Spectrum beta-lactamase-  
1482 producing *Escherichia coli* as causative agent of bovine Mastitis **Foodborne Pathogens**  
1483 **and Disease**, v. 13, n. 9, p. 1-6, 2016.
- 1484 PITOUT, J. D. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of  
1485 virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 9, 2012.
- 1486 PITOUT, J. D. D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M- $\beta$ -lactamases  
1487 produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Journal of clinical microbiology**, v.  
1488 42, n. 12, p. 5715-5721, 2004.

- 1489 PITOUT, J.D.D.; LAUPLAND, K.B. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing  
1490 Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **The Lancet infectious**  
1491 **diseases**, v. 8, n. 3, p. 159-166, 2008.
- 1492 POIREL, L. et al. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-  
1493 spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-  
1494 M-3. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 1031–1034, 2002.
- 1495 POIREL, L. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes.  
1496 **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 40, n. 1, p. 119-123, 2011.
- 1497 POIREL, L. et al. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial**  
1498 **Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**, p. 289-316, 2018.
- 1499 POWERS, R. A. Structural and functional aspects of extended-spectrum AmpC  
1500 cephalosporinases. **Current Drug Targets**, v. 17, n. 9, p. 1051-1060, 2016.
- 1501 QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries:  
1502 epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clinical**  
1503 **Microbiology Reviews**, v. 18, n. 3, p. 465-483, 2005.
- 1504 RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle,**  
1505 **horses, sheep, pigs and goats**. 10. ed. Spain, Saunders Elsevier, 2007. p. 673-762.
- 1506 RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary  
1507 gland. **Veterinary Research**, v. 37, n. 3, p. 369-400, 2006.
- 1508 RAHMAN, S. et al. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum  
1509 beta-lactamases. **BioMed Research International**, v. 2018, Article ID 9519718, p. 1-  
1510 14, 2018.
- 1511 RIBEIRO, M. G. et al. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de  
1512 antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária**  
1513 **Brasileira**. v. 29, p. 52-58, 2009.
- 1514 RODRIGUES, J. et al. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia*  
1515 *coli* of the classic serogroup O55. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2680-2686,  
1516 1996.
- 1517 RODRIGUEZ-SIEK, K. E. et al. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary**  
1518 **Research**, v. 36, n. 2, p. 241-256, 2005.

- 1519 ROGERS, B. A. et al. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant,  
1520 community-associated strain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 1, p.  
1521 1-14, 2011.
- 1522 RUEGG, P. L. New perspectives in udder health management. **Veterinary Clinics:**  
1523 **Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 149-163, 2012.
- 1524 RUEGG, P. L. Making antibiotic treatment decisions for clinical mastitis. **Veterinary**  
1525 **Clinics: Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 413-425, 2018.
- 1526 RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for  
1527 extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of**  
1528 **Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754, 2000.
- 1529 SAIDANI, M. et al. Epidemiology, antimicrobial resistance, and extended-spectrum  
1530 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in clinical bovine mastitis in  
1531 Tunisia. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 8, p. 1242-1248, 2018.
- 1532 SANTOS, M. V. Mastite bovina e o uso de antibióticos. **Mundo do leite**. p. 18-20,  
1533 2013. Disponível em: <http://qualileite.org/pdf/Artigos-tecnicos-publicados-em-revista-de-divulgacao/Mundo-do-leite/2013/2.pdf> Acesso em 14 jun. 2019.
- 1535 SAVARINO, S. J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1  
1536 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proceedings of the National**  
1537 **Academy of Sciences USA**, v. 90, p. 3093-3097, 1993.
- 1538 SCHEMBRI, M. A. et al. Capsule shields the function of short bacterial  
1539 adhesins. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1249-1257, 2004.
- 1540 SCHMIDT, H. et al. Development of PCR for screening of enteroaggregative  
1541 *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 701-705, 1995a.
- 1542 SCHULTSZ, C. et al. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by  
1543 using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **Journal of**  
1544 **Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2393-2397, 1994.
- 1545 SELLERA, Fábio P. et al. Identification of KPC-2-producing *Escherichia coli* in a  
1546 companion animal: a new challenge for veterinary clinicians. **Journal of Antimicrobial**  
1547 **Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2259-2261, 2018.

- 1548 SEPPÄLÄ, H. et al. The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics  
1549 on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. **New England Journal**  
1550 **of Medicine**, v. 337, n. 7, p. 441-446, 1997.
- 1551 SHARMA, G. et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic  
1552 strategies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 309-319, 2016.
- 1553 SHPIGEL, N. Y. et al. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. **Current Opinion in**  
1554 **Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 60-65, 2008.
- 1555 SIU, L. K. et al. High-level expression of *ampC*  $\beta$ -lactamase due to insertion of  
1556 nucleotides between -10 and -35 promoter sequences in *Escherichia coli* clinical isolates:  
1557 cases not responsive to extended-spectrum-cephalosporin treatment. **Antimicrobial**  
1558 **Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 2138-2144, 2003.
- 1559 SOKURENKO, E. V. et al. Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural  
1560 variation of the FimH adhesin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.  
1561 95, n. 15, p. 8922-8926, 1998.
- 1562 STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of  
1563 testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production  
1564 by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.
- 1565 SUOJALA, L. et al. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of  
1566 *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 147,  
1567 n. 3-4, p. 383-388, 2011.
- 1568 SZALO, I. M. et al. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and  
1569 enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins  
1570 of human EHEC strains. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 653-658, 2002.
- 1571 TENNANT, S. M. et al. Characterization of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of  
1572 clinical origin. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 117, 2009.
- 1573 TIMOFTE, D. et al. Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-  
1574 M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12  $\beta$ -lactamases from bovine mastitis isolates in  
1575 the United Kingdom. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 789-  
1576 794, 2014.
- 1577 TOMA, C. et al. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic  
1578 *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2669-2671, 2003.

- 1579 TOMA, C. et al. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga  
1580 toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p.  
1581 4937-4946, 2004.
- 1582 TOMAZI, T. et al. Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical  
1583 mastitis in 20 Brazilian dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 161, p. 9-18,  
1584 2018.
- 1585 TRABULSI, L. R. et al. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia*  
1586 *coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508, 2002.
- 1587 TRABULSI, L.R. et al. *Enterobacteriaceae*. In: Trabulsi LR, Alterthum F.  
1588 Microbiologia. 4.ed. Atheneu: São Paulo, p.269-276, 2005.
- 1589 VIKRAM, Amit; SCHMIDT, John W. Functional bla KPC-2 sequences are present in  
1590 US beef cattle feces regardless of antibiotic use. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.  
1591 15, n. 7, p. 444-448, 2018.
- 1592 WALK, S. T. et al. Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. **Applied and**  
1593 **Environmental Microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6534-6544, 2009.
- 1594 WANG, R. et al. Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:  
1595 H7 and Non-O157 strains and their tolerance to sanitizers commonly used in the food  
1596 processing environment. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 8, p. 1418-1428, 2012.
- 1597 WHO, World Health Organization. **Critically important antimicrobial agents for**  
1598 **human medicine**, 3rd ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011.
- 1599 XAVIER, B. B. et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance  
1600 gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **EuroSurveillance Monthly**, v.  
1601 21, n. 27, p. 30280, 2016.
- 1602 YAGI, T. et al. A preliminary survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in  
1603 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. **FEMS**  
1604 **Microbiology Letters**, v. 184, n. 1, p. 53-56, 2000.
- 1605 YAICI, L. et al. bla<sub>NDM-5</sub>-carrying IncX3 plasmid in *Escherichia coli* ST1284 isolated  
1606 from raw milk collected in a dairy farm in Algeria. **Journal of Antimicrobial**  
1607 **Chemotherapy**, v. 71, n. 9, p. 2671-2672, 2016.

- 1608 YAMAMOTO, S. et al. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by  
1609 multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**,  
1610 v. 12, n. 2, p. 85-90, 1995.
- 1611 YANG, et al. Characteristics of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from  
1612 bovine mastitis in China. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 7, p. 6244-6252, 2018.
- 1613 YANG, X. et al. Biofilm formation and susceptibility to biocides of recurring and  
1614 transient *Escherichia coli* isolated from meat fabrication equipment. **Food Control**, v.  
1615 90, p. 205-211, 2018.
- 1616 YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a  
1617 carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and**  
1618 **Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.
- 1619 YONG, D. et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla* (NDM-1),  
1620 and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in  
1621 *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and**  
1622 **Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.
- 1623 YU, Z. N. et al. Prevalence, Antimicrobial-resistance phenotypes and genotypes of  
1624 *Escherichia coli* isolated from raw milk samples from mastitis cases in four regions of  
1625 china. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2019.
- 1626