

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E
VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PERFIL GENÉTICO E MICROBIOLÓGICO DE CEPAS DE
Escherichia coli ISOLADAS DE LEITE MASTÍTICO
BOVINO**

Patrícia Merenda Rangel
Biomédica

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E
VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PERFIL GENÉTICO E MICROBIOLÓGICO DE CEPAS DE
Escherichia coli ISOLADAS DE LEITE MASTÍTICO
BOVINO**

Patrícia Merenda Rangel

Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária. Área de concentração em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Maio de 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PATRÍCIA MERENDA RANGEL – nascida no dia 30 de dezembro de 1981, cursou Biomedicina no Centro Universitário Barão de Mauá, campus Ribeirão Preto, onde obteve o título de bacharel em análises clínicas em dezembro de 2003. Em 2007 tornou-se Mestre em Microbiologia Agropecuária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal.

**FRACASSO NUNCA TE SURPREENDERÁ SE TUA VONTADE
DE VENCER FOR MAIOR.”**

(Autor desconhecido)

Dedico

Aos meus queridos pais, Dirceu e Sueli,
que nunca deixaram de acreditar nos meus sonhos,
que proporcionaram todos os momentos felizes da minha vida,
que sempre estiveram ao meu lado e
que me ensinaram a buscar o caminho da vitória,
muito obrigada!

Ofereço

Ao meu orientador e amigo, Prof. José Moacir Marin,
que me ensinou tudo que sei hoje.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pois nenhuma folha cai se não for a Sua vontade.
- Ao professor José Moacir Marin, que me passou muito conhecimento durante esses anos.
- Aos meus amigos do laboratório, pelo auxílio e ensinamento.
- Aos meus amigos queridos e as meninas da república, que sempre me incentivaram e apoiaram.
- A Tânia, técnica do laboratório, que sempre me socorreu nos momentos difíceis.
- Ao Dr. Inivaldo Corrêa e Dra. Maria da Graça P. Corrêa do laboratório Vitafort, pela contribuição e por ceder as amostras de leite para a realização deste trabalho.
- A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP campus Jaboticabal, por ter aceitado meu trabalho.
- A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.
- A faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, por permitir a realização deste em suas dependências.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Que Deus abençoe a todos vocês.”

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	II
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
RESUMO.....	VI
SUMMARY.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Mastite bovina.....	3
2.2 <i>Escherichia coli</i>	5
2.2.1 Classes de <i>E.coli</i>	6
2.3 Resistência antimicrobiana.....	11
3. OBJETIVO.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Animais.....	14
4.2 Colheita do material.....	14
4.2.1 Colheita do leite através de testes utilizados no campo.....	14
4.2.2 Teste CMT – Califórnia Mastite Teste.....	15
4.2.3 Colheita das amostras de leite.....	16
4.3 Recepção de amostras e isolamento de linhagens bacterianas.....	16
4.4 Sorotipagem.....	18
4.4.1 Técnica de aglutinação em lâmina.....	19
4.5 Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	19
4.6 Extração DNA.....	20
4.7 Reação para amplificação do gene <i>eae</i>	21
4.8 Meios de cultura utilizados.....	22
4.9 Conservação das cepas de <i>E.coli</i>	25
5. RESULTADOS.....	26
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO.....	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AAF - plasmídeo que expressa adesina
A/E – ligação e entumescimento (“attaching and effacing”)
BFP – pili em forma de feixe (“Bundle-Forming-Pilus”)
CCS - contagem de células somáticas
CMT – Califórnia Mastite Teste (“California Mastitis Test”)
CNF - fator citotóxico de necrose
COOH – carboxila
DAEC – *Escherichia coli* que adere difusamente
DNA – ácido desoxiribonucéico
eae – gene de ligação e entumescimento (“attaching and effacing”)
EaggEC - *Escherichia coli* enteroagregativa
EAST - enterotoxina termoestável
EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora
EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica clássica
EspA, EspB e EspD - proteínas
ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica
g - gramas
H – antígeno flagelar
HEp-2 – células de carcinoma epidermóide de laringe humana
HUS – síndrome hemolítica urêmica
K – antígeno capsular
LEE – local de entumescimento no enterócito (“locus of enterocyte effacement”)
L: litro
LT – termolábel
meio LB – meio Luria Bertoni
Mm - milimol
mL – mililitro
O – antígeno somático
°C – graus Celsius

PCR – reação de polimerase em cadeia (“Polimerase Chain Reaction”)

Pb – pares de base

rpm – rotação por minuto

ST – termoestável

STEC – *Escherichia coli* Shiagatoxigênica

Stx – shigatoxina

tir – gene receptor para a intimina

VT – verotoxina

VTEC – *Escherichia coli* verocitotoxigênica

μL - microlitro

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Distribuição dos sorogrupos O de 187 cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de leite provenientes de vacas com mastite.....	27
TABELA 2. Susceptibilidade de 231 cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de leite provenientes de vacas com mastite frente a 12 agentes antimicrobianos.....	28
TABELA 3. Distribuição dos fenótipos de multiresistência de 27 cepas de <i>Escherichia coli</i> resistentes a 4 ou mais agentes antimicrobianos, em isolados provenientes de leite de vacas com mastite.....	31
TABELA 4. Fatores de virulência de cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de leite mastítico provenientes de dois estados brasileiros no período de fevereiro a novembro de 2004.....	32

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Susceptibilidade de 231 cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de leite provenientes de vacas com mastite frente a 12 agentes antimicrobianos.....	29
FIGURA 2. Distribuição da multiresistência de 152 cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de leite mastítico bovino.....	30
FIGURA 3. Eletroforese em gel TAE 1,5% de PCR para a detecção do gene stx1 e stx2 de <i>E.coli</i> isoladas de leite mastítico.....	33
FIGURA 4. Eletroforese em gel TAE 1,5% de PCR para a detecção do gene eae de <i>E.coli</i> isoladas de leite mastítico.....	34

PERFIL GENÉTICO E MICROBIOLÓGICO DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE LEITE MASTÍTICO BOVINO

RESUMO

A um longo tempo a mastite tem sido reconhecida como a doença que provoca as maiores perdas econômicas nos rebanhos leiteiros. De fevereiro a novembro de 2004, 670 amostras de leite mastítico bovino, provenientes de dois estados brasileiros foram coletadas, das quais foram isoladas 231 cepas de *Escherichia coli*. Estas cepas foram analisadas para a detecção dos genes de produção de Shiga toxina (*stx* 1 e *stx* 2) e do gene da intimina (*eae*). Vinte cepas (8,6%) foram detectadas através de PCR contendo os genes da Shiga toxina (8 *stx* 1, 12 *stx* 2 e nenhuma delas ambos os genes). Duas cepas (0,8%) de *E. coli* eram *eae* positivo não produtoras de Shiga toxina. As cepas de *E. coli* foram também examinadas para detectar a resistência a 12 agentes antimicrobianos. As resistências mais comuns foram para tetraciclina (92,2%), estreptomicina (90,4%), ácido nalidíxico (88,3%), amicacina (86,5%) e cefalotina (84,8%). A resistência a múltiplas drogas foi encontrada em 152 cepas (65,8%). Entre os sorogrupos determinados, O111, O26, O158 e O125 foram os mais comuns, todos sorogrupos EPEC clássicos.

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli*, mastite, agentes antimicrobianos, STEC, gene *eae*, sorogrupos.

GENETIC NA MICROBIOLOGIC PROFILE OF *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED FROM MASTITIC BOVINE MILK

SUMMARY

Mastitis has been recognized for some time as the most costly disease in dairy herds. From February to November 2004, 670 samples of bovine mastitic milk were collected from two Brazilian states, from which 231 *Escherichia coli* strains were isolated. These strains were screened for the presence of Shiga toxin-producing (*stx* 1 and *stx* 2) and intimin (*eae*) genes. Twenty (8.6%) strains were detected by PCR to harbor the Shiga toxin genes (8 the *stx* 1 gene, 12 the *stx* 2 gene and none both of them) Two (0.8%) of the *E. coli* strains studied were *eae* positive non Shiga toxin-producing. The *E coli* strains were also examined for resistance to 12 antimicrobial agents. The most commonly observed resistance was to tetracycline (92.2%), streptomycin (90.4%), nalidixic acid (88.3%), amikacin (86.5%) and cephalothin (84.8%). Multidrug resistance was found among 152 isolates (65.8%). Among the serogroups determined O111, O26, O158 and O125 were the most commonly, all of them classic EPEC serogroups.

KEY-WORDS: *Escherichia coli*, mastitis, antimicrobial agents, STEC, *eae* gene, serogroups.

1. INTRODUÇÃO

Mastite é uma reação inflamatória da glândula mamária, normalmente causada por uma infecção bacteriana e é, economicamente, a doença mais importante em propriedades produtoras de leite do Brasil e do mundo, pois causa baixa produtividade do leite e reduz a sua qualidade.

A mastite de origem infecciosa ocorre em cerca de 90 a 95% dos casos, podendo ser causada por um ou mais microrganismos, já a de origem traumática ocorre em cerca de 5 a 10% dos casos. Além das bactérias, que são os principais microrganismos responsáveis pela mastite, fungos e algas, também, podem estar envolvidos simultaneamente ou não nesta enfermidade.

A mastite pode ser classificada como mastite clínica (severa) ou subclínica (moderada). Mastite clínica apresenta alterações dos úberes e do leite, visíveis a olho nu. É caracterizada por sinais no úbere como dor, edema, aumento de temperatura, enquanto, no leite podem ocorrer mudanças como a presença de grumos e dependendo do grau da infecção pode levar a uma secreção aquosa. A mastite subclínica é a mais comum em propriedades leiteiras e de maior preocupação, pois pode acometer grande parte do rebanho sem que seja percebida, devido a não apresentação de sinais sistêmicos aparentes. Esta forma de mastite é a maior responsável por grandes perdas na produção leiteira e na qualidade do leite.

Epidemiologicamente, a mastite bovina divide-se em mastite contagiosa e ambiental. A mastite ambiental caracteriza-se pelo fato do reservatório do patógeno estar localizado no próprio ambiente das vacas leiteiras, sendo as bactérias gram-negativas as mais freqüentes, principalmente a *Escherichia coli*.

A *E.coli* é um bacilo gram-negativo pertencente à microbiota intestinal dos bovinos, e este representa um reservatório natural para linhagens de *E.coli* enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), Shigatoxigênica (STEC) e enterohemorrágica (EHEC), as quais em determinado momento tornam-se predominante na microbiota intestinal, podendo provocar alterações no animal, sendo mastite é uma das mais comuns.

A contaminação da carne e do leite representa um sério risco à saúde

humana, uma vez que sorotipos de *E.coli* encontrados em bovinos como agentes infecciosos, também são responsáveis por doenças em seres humanos, especialmente diarreia aguda em crianças e adultos.

A terapia com antibiótico é a primeira opção de tratamento utilizada para combater os casos de mastite, o seu uso vai depender da capacidade do medicamento de atingir todos os locais da infecção e manter uma concentração mínima por um período suficiente para eliminar os microrganismos. O antibiótico pode ser administrado via sistêmica ou intramamária.

Os casos de mastite são usualmente tratados sem a prévia identificação laboratorial dos agentes patogênicos e testes de sensibilidade antimicrobiana. No Brasil, existem diversos tipos de drogas que são utilizadas pelos produtores, sem um maior controle por parte do Ministério da Agricultura, e isto proporciona uma seleção de cepas de microrganismos altamente resistentes a estes antimicrobianos. Neste contexto, a produção intensiva de leite de alta qualidade, e sem resíduos de antibióticos, reveste-se de extrema importância para os produtores, ao se considerar os prejuízos e as penalidades decorrentes da rejeição do leite contaminado com valores acima dos níveis de tolerância.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. 1. Mastite bovina

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária de evolução agudo ou crônico. É uma doença multifatorial que pode ter diferentes causas, grau de intensidade e variações de conseqüências e duração. Apresenta-se sob a forma clínica ou subclínica na dependência dos sinais de inflamação; acomete mais freqüentemente os ruminantes, sendo causada predominantemente por agentes bacterianos (BLOOD & RADOSTITS, 1991).

Enquadrada entre as principais doenças dos bovinos de leite, a mastite interfere na economia da produção leiteira mundial, principalmente por reduzir a produtividade dos rebanhos infectados (BRITO & BRESSAN, 1996). Além disso, afeta significativamente a composição do leite, o rendimento industrial e a qualidade dos produtos lácteos; 17 a 20% da população mundial de vacas leiteiras apresentam mastite em algum momento de sua vida produtiva, reduzindo a produção de 10 a 15% (SANTOS, 2001).

Mastite em vacas e outros ruminantes domésticos leiteiros representa um prejuízo econômico no mundo inteiro (BLOOD & RADOSTITS, 1991). Os maiores custos estão associados com a redução na produção de leite, descarte do leite, substituição precoce do animal, redução no valor da venda do animal, drogas e serviço de veterinários. A realização da terapia antimicrobiana sem conhecimento prévio dos agentes e do seu perfil de suscetibilidade diante dos princípios utilizados poderá resultar em insucesso e maiores prejuízos ao produtor (COSTA *et al.*, 1996), além de oferecer riscos à saúde do consumidor, em decorrência da maior possibilidade de desenvolvimento de espécies bacterianas multirresistentes e da presença de resíduos dos antimicrobianos no leite.

A mastite apresenta duas formas de manifestação; a clínica e subclínica. A mastite clínica é caracterizada por sinais sistêmicos, como anorexia, depressão, toxemia, febre e sinais locais como endurecimento do úbere, edema, aumento na temperatura, hiperemia e dor. Também podem ser observadas alterações na

secreção mamária; normalmente o leite pode ter coágulos e pus, e com o progresso da infecção pode conduzir a uma secreção aquosa (SARAN, 1986 in CORRÊA, 2003). Estes sintomas podem ser visíveis a olho nu.

Perdas extremamente significativas na produção e deterioração da qualidade do leite estão associadas com a mastite subclínica, a qual só é identificada com testes específicos. A mastite subclínica não apresenta sintomas aparentes, entretanto, ocasiona alterações no leite, tais como, aumento da contagem de células somáticas (CCS), aumento nos teores de íons cloro, sódio e proteína sérica, diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura do leite, o que limita a exploração econômica da raça leiteira (BRAMLEY *et al.*, 1996).

A forma subclínica apresenta uma maior importância epidemiológica, pois pode propagar-se silenciosamente pelo rebanho sem que sejam percebidas alterações macroscópicas do úbere ou da sua secreção (BLOOD & RADOSTITS, 1991). É a mais importante, devido a maior prevalência nos rebanhos, ocorrendo de 15 a 40 vezes mais do que a forma clínica. Esta forma de mastite é de difícil detecção e de longa duração (PHILPOT & NICKERSON, 1991).

A mastite infecciosa é a mais freqüente, e entre os agentes mais importantes estão as bactérias. Porém, os fungos e algas também estão envolvidos em sua gênese (LANGONI *et al.*, 1998). WATTS (1988) relatou a participação de 137 espécies de microrganismos, o que reforça a complexidade etiológica desta afecção, dificultando em algumas situações o seu tratamento e controle.

A mastite não tratada é uma das causas de perdas contínuas na economia da indústria leiteira (SORDILO *et al.*, 1997).

Os microrganismos envolvidos na gênese da mastite bovina foram agrupados de acordo com as fontes de infecção e vias de transmissão, e classificados como contagiosos ou ambientais (RIBEIRO *et al.*, 2002). Na mastite contagiosa, ocorre a transferência dos microrganismos de uma glândula infectada para uma glândula não infectada, durante o processo de ordenha, pelas mãos do retireiro ou através de toalhas utilizadas para limpeza do úbere. Sendo assim, as infecções podem ser controladas, ou pelo menos diminuídas por medidas simples, como anti-sepsia dos tetos imediatamente após a ordenha, pela não reutilização de toalhas, ou uso de toalhas descartáveis e pela higiene das mãos do retireiro

(EBERHART *et al.*, 1990).

A mastite ambiental caracteriza-se pelo fato do reservatório do patógeno estar localizado no próprio ambiente das vacas leiteiras, sendo as bactérias gram-negativas as mais freqüentes, principalmente a *Escherichia coli* (MARGATHO *et al.*, 1998). Os coliformes são habitantes naturais da microbiota intestinal dos bovinos, portanto estão presente em suas fezes, desta forma podem ser facilmente encontrados no solo. Assim as fezes representam uma grande fonte deste microrganismo no ambiente das fazendas. Materiais orgânicos usados como cama para o gado representam um importante reservatório para os patógenos ambientais. Esses materiais estão frequentemente em contato com as extremidades das tetas (EBERHART *et al.*, 1979). Durante as estações chuvosas como o verão, ocorre o aumento da umidade neste ambiente, o que facilita ainda mais a proliferação destes microrganismos (SMITH *et al.*, 1985).

Os programas de controle de mastite visam diminuir a prevalência da doença a níveis aceitáveis, uma vez que sua erradicação não é viável. Entre as medidas recomendadas para o controle das mastites produzidas pela maioria dos organismos incluem-se medidas higiênicas. Esses procedimentos, entretanto, não são tão eficazes contra as infecções intramamárias produzidas por microrganismos de origem ambiental ou oportunista (REIS *et al.*, 2003).

2. 2. *Escherichia coli*

A *E.coli* foi descrita pela primeira vez por Theodor Von Escherich em 1885, sendo denominada inicialmente de *Bacterium coli*. Por fazer parte da microbiota da maioria dos animais e do homem, ela foi por muito tempo considerada não patogênica. No entanto, ao longo de anos de pesquisas esta enterobactéria vem sendo associada a infecções localizadas e sistêmicas tanto em seres humanos como em animais (KONEMAN *et al.*, 1997).

E.coli é um coco-bacilo Gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, não esporulado, a maioria móvel e aeróbio ou anaeróbio facultativo predominante na microbiota intestinal dos seres humanos e animais de

sangue quente (KONEMAN et al., 1997). É um microrganismo que coloniza tipicamente o trato gastrointestinal infantil dentro de poucas horas de vida, e, dali em diante, a *E.coli* e o hospedeiro obtêm benefícios mútuos, como a fabricação de vitaminas K e B. A *E.coli* permanece inofensivamente confinada na luz intestinal do intestino grosso, contudo em um hospedeiro debilitado ou imunossuprimido ou quando barreiras gastrintestinais são violadas, as cepas de *E.coli* mesmo as não patogênicas podem causar uma infecção. Três síndromes em geral resultam de infecções inerentes às cepas patogênicas de *E.coli*: infecções do trato urinário, septicemia e diarreia (NATARO & KAPER, 1998).

As cepas de *E.coli* são freqüentemente identificadas através de reações bioquímicas. Contudo, esse método deve ser usado com cautela, pois apenas 90% dessas cepas são lactoses positivas; algumas cepas de *E.coli* diarreicas, incluindo muitas cepas enteroinvasiva, são lactoses negativas. O teste do indol, positivo em 99% das cepas de *E.coli*, é o melhor teste para identificação dos outros membros da família *Enterobacteriaceae* (TRABULSI et al., 2002).

A sorotipagem ocupa um lugar de destaque no estudo deste microrganismo. Em 1944, KAUFFMAN (in NATARO & KAPER, 1998) propôs um esquema para a classificação sorológica de *E.coli*, que permanece sendo usado até os dias atuais. De acordo com o esquema de KAUFFMAN, as *E.coli* são sorotipadas com base em seu antígeno somático (O), flagelar (H) e capsular (K), sendo que a quantidade de antígenos identificados aumenta a cada ano. São conhecidos atualmente 174 antígenos O, 100 antígenos K e 57 antígenos H. Uma combinação específica de antígenos O e H define o sorotipo de uma linhagem, enquanto que apenas a identificação do antígeno O define o sorogrupo desta linhagem (NATARO & KAPER, 1998).

Dos 174 sorogrupos O identificados, 60 foram encontrados na espécie humana. Destes 60, cerca de 25 fazem parte da microbiota intestinal, e a maioria também está associada a infecção urinária, meningite e bacteremia. Os outros 35 sorogrupos são agentes de infecções intestinais (NATARO & KAPER, 1998).

2. 2.1. Classes de *E.coli*

De acordo com a patogenicidade, as *E. coli* foram classificadas em 7 classes (TRABULSI *et al.*, 2002):

EPEC: enterotoxigênica

EPEC: enteropatogênica

EHEC: enterohemorrágica

STEC ou VTEC: produtora de verotoxina

EIEC: enteroinvasiva

EaggEC ou EAEC: enteroagregativa

DAEC: difusamente aderente

A classe EHEC também é conhecida por STEC (“Shiga Toxin Producing” *E.coli*) ou VTEC (“Vero Toxin Producing” *E.coli*), estão associadas à doença em humanos e animais (KUHNERT *et al.*, 2000). As shigatoxinas (Stx) ou verocitotoxinas (VT) são encontradas em uma grande variedade de plantas e em algumas bactérias (EHEC), que possuem atividade enzimática (KUHNERT *et al.*, 2000).

KONOWALCHUC *et al.* (1977), observaram pela primeira vez que VTEC produzia uma potente enterotoxina termolábil capaz de causar efeito citotóxico em células Vero (células de rim de macaco verde africano), então a denominaram de verotoxina (VTEC). Em 1983, O'BRIEN & LA VECK observaram que a atividade VTEC podia ser neutralizada por anticorpos específicos para a toxina Shiga, uma toxina extracelular de *Shigella dysenteriae*, assim passaram a referi-la como toxina “Shiga-like” (SLTEC) ou simplesmente STEC.

Múltiplos fatores de virulência contribuem para a patogenicidade da EHEC, incluindo a produção de Stx na habilidade do patógeno em causar lesões nas microvilosidades da parede intestinal do hospedeiro (KARMALI, 1989; KUHNERT *et al.*, 2000). As *E.coli* Stx são classificadas em dois tipos, *E.coli* Stx tipo 1 (Stx1 ou VT1) e *E.coli* Stx tipo 2 (Stx2 ou VT2); apesar de ser extremamente similar a Stx1 no modo de ação, estrutura e características bioquímicas, a Stx2 difere na capacidade de provocar doenças (SCOTLAND *et al.*, 1985). Geralmente a Stx no epitélio intestinal de bovinos não causa citotoxicidade. As Stx são proteínas que apresentam uma subunidade A (30-35 kDa) e cinco subunidades B (entre 7 e 11 kDa). A

subunidade A inibe a síntese protéica de células eucarióticas e as subunidades B são responsáveis pela ligação da toxina aos receptores celulares (STROCKBINE *et al.*, 1988).

O trato gastrintestinal de bovinos é um importante reservatório de linhagens virulentas e não-virulentas de STEC, e o consumo de carne crua ou mal cozida contaminada pelas fezes destes animais, ingestão de leite cru ou pelo manuseio de materiais contaminados, são as formas de infecção para o homem (KUHNERT *et al.*, 2000; STEVENS *et al.*, 2002). As STEC podem causar desde uma diarreia branda, sanguinolenta (colite hemorrágica) à síndrome hemolítica urêmica (HUS) em crianças e adultos, com maiores ou menores efeitos conforme as condições imunológicas do indivíduo (KRISHMAN *et al.*, 1987; CRAY JR, *et al.*, 1996; JENKINS *et al.*, 2003; BETTELHEIM *et al.*, 2005). A HUS provoca a maior complicação das infecções, caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda, que pode estender-se a outros órgãos (CRAY JR, *et al.*, 1996). Em 1983 ocorreram dois surtos epidemiológicos para STEC, o primeiro, nos Estados Unidos, caracterizado por uma severa dor abdominal seguida por diarreia líquida sanguinolenta (colite hemorrágica), foi associada à ingestão de “hamburgers” mal cozidos, em uma rede de “fast food” (RILEY *et al.*, 1983), e o segundo, no Canadá, onde crianças apresentavam a HUS, também associada à ingestão de alimentos mal cozidos (KARMALI *et al.*, 1983). Na HUS há uma destruição de eritrócitos e falha aguda dos rins, podendo levar o indivíduo a óbito (NASCIMENTO & STAMFORD, 2000).

Há mais de 400 sorotipos de STEC isolados de gado (BLANCO *et al.*, 2004). A diversidade de *E.coli* comensal não-STEC presente na microflora intestinal bovina é de grande interesse, uma vez que esses organismos podem potencialmente adquirir genes de virulência pelo mecanismo de transferência horizontal de genes, via mobilidade genética de elementos, por exemplo, como os fagos (HACKER & KAPER, 2000).

MOON *et al.*, em 1983, descreveu uma lesão intestinal produzida por *E.coli* como “attaching – effacing” (A/E), após observar a ligação íntima da bactéria à superfície apical do enterócito (“attaching”) e um entumescimento nas

microvilosidades intestinais ("effacing"), produzindo uma enterotoxina termoestável (EAST10). Os genes cromossômicos de patogenicidade que codificam as lesões histopatológicas estão presentes em uma ilha de patogenicidade de 35.6 Kb, denominada por "locus of enterocyte effacement" (LEE) (MOON et al., 1983; McDANIEL et al., 1995; FRANKEL et al., 1998). Os LEE foram primeiramente descritos em EPEC E2348/69 por McDANIEL et al. (1995), mas também estão presentes em EHEC, *Hafnia alvei*, *Citrobacter rodentium* e em *E.coli* patogênicas em várias espécies animais (FRANKEL et al., 1998). Estes genes são organizados em três regiões principais com funções conhecidas. A região média contém os genes *eae* (que codificam a adesina intimina necessária no processo attaching - effacing) e o gene *tir* (que codifica um receptor para a intimina que é transportado para as células do hospedeiro através do sistema de secreção tipo III), os produtos que estão envolvidos na aderência da vilosidade epitelial (FRANKEL et al., 1998). Os genes *eae* e *tir* são os que codificam o sistema de secreção tipo III (ELLIOT et al., 1998; FRANKEL et al., 1998). A terceira região dos LEE, situada abaixo dos genes *eae*, codifica diversas proteínas que são secretadas através do sistema de secreção tipo III; as mais proeminentes destas proteínas são EspA, EspB e EspD (FRANKEL et al., 1998).

Existe um número muito grande de sorotipos de EHEC, mas a *E.coli* O157:H7 é o mais importante. A *E.coli* O157:H7 pode causar grande surto de intoxicação alimentar, em humanos, decorrentes da ingestão de alimentos e água contaminados (RILEY et al., 1983; KARMALI et al., 1983; STEVENS et al., 2002), podendo ser encontrada na microflora intestinal de bovinos, suínos, caprinos, caninos, felinos e aves (BEUTIN et al., 1993), mas sem causar-lhes doença ou causando-lhes apenas uma diarreia branda; portanto, são considerados um reservatório da bactéria O157 (ELDER & KEEL, 2000); entretanto, a maioria destas bactérias são não-O157. Dependendo das condições e da sobrevivência do patógeno nas fezes dos animais contaminados com *E.coli* O157:H7, estas fezes são uma importante fonte de reinfecção para o rebanho e contaminação do meio ambiente (WANG et al., 1996; STEVENS et al., 2002). Esta bactéria pode se manter viável na água por um longo tempo, contaminando grandes áreas de abastecimento rural, urbano e de lazer aquático (CHALMERS et al., 2000; STEVENS et al., 2002;

SOLOMON et al., 2002).

A STEC está frequentemente associada à infecção em humanos, pelo consumo de carne contaminada mal cozida e leite cru; também pelo consumo de hortaliças, frutas e águas contaminadas por detritos de animais portadores, através do uso de esterco nas plantações ou, pelos detritos presentes no pasto, ou até mesmo por contaminação de pessoas que trabalham diretamente em contato com estes animais e seus detritos (RILEY et al., 1983; DOYLE et al., 1991; SILVA et al., 2001). O gado sadio é normalmente um portador da E.coli O157:H7 e, este é frequentemente encontrado no gado doente; mas isolar este gado doente não resolve o problema, uma vez que ele dissemina o patógeno por todo o campo, contaminando o solo e águas próximas ao pasto (WANG et al., 1996).

O uso de antibióticos nas infecções por VTEC representa uma controvérsia: pode ser um fator de risco, por exemplo, para a síndrome urêmica hemolítica. Estudos *in vitro* demonstraram que alguns tipos de antibióticos aumentariam a produção e liberação de toxinas, por exemplo, quando há exposição à quinolonas e cotrimoxazol produzindo grande liberação de toxinas. Por outro lado, outro estudo descreveu que se produzia diminuição da produção de VT ao utilizar norfloxacin, kanamicina, ampicilina, fosfomicina e claritomicina em ratos, pela diminuição de excreção de VTEC. Do ponto de vista clínico, outras experiências mostraram que certos antimicrobianos, administrados precocemente durante a infecção, poderiam prevenir a progressão da doença (REYES et al., 2004).

EPEC é uma importante categoria de *E.coli* diarréica, a qual tem sido associada à diarréia infantil severa nos países em desenvolvimento, principalmente associadas aos sorogrupos O111 e O119, caracterizada por diarréia aquosa e sanguinolenta. A existência destas bactérias foi descoberta em 1945, sendo, portanto, as primeiras *E.coli* implicadas em diarréia. O reservatório parece ser o próprio homem (TRABULSI et al., 2002). Aderem intimamente às células da mucosa intestinal (pela intimina expressada pelo gene *eae*) através do pilus BFP ("Bundle-Forming-Pilus"), pelo fenômeno "attaching – effacing" (A/E), em célula HEp-2 (células de carcinoma epidermóide de laringe humana), mediadas pelo BFP (KAPPER et al., 1995; JAWETS et al., 2000). É um plasmídeo que expressa uma

adesina (AAF/1) e produz uma enterotoxina termoestável (EAST1) (NATARO et al., 1992). As EPEC são classificadas em: I ou clássica (aderência em Hep-2) e II (aderência difusa ou ausente em Hep-2). Cepas de EPEC têm sido isoladas de uma grande variedade de alimentos, tais como carne, vegetais, frutas, leite e produtos lácteos (ARAUJO et al., 2002).

2. 3. Resistência antimicrobiana

O aparecimento e a disseminação de resistência a drogas antimicrobianas entre as bactérias são considerados atualmente como um sério problema de saúde pública, e o controle dessa disseminação como um desafio à ciência (COHEN, 2000). Uma pressão seletiva favorecendo os genótipos resistentes a antimicrobianos é exercida sempre que estas drogas são utilizadas de forma terapêutica para o tratamento de infecções em Medicina humana e veterinária. Como uma consequência desta pressão seletiva e devido ao uso indiscriminado destas drogas nas últimas décadas ocorreu um aumento extraordinário do nível de resistência a agentes antimicrobianos apresentado pelas bactérias de origem humana ou de outros animais (ANGULO et al., 2000; TEUBER, 2001; LEVY, 2002).

O nível de resistência apresentado pelas bactérias comensais tem sido proposto como um índice indicativo adequado para a avaliação da resistência a antimicrobianos apresentada pelas populações bacterianas, bem como um índice de avaliação da exposição destas bactérias as diferentes drogas antimicrobianas (CAPRIOLI et al., 2000). Além disso, a aquisição de resistência pelas bactérias comensais é motivo de preocupação, pois a microbiota pode atuar como um reservatório potencial de genes de resistência a drogas antimicrobianas, as quais podem ser transferidas para uma bactéria patogênica dentro de um hospedeiro (SUMMERS, 2002).

A antibióticoterapia é usualmente a primeira opção de tratamento das mastites. Desta forma, é de extrema importância o isolamento e identificação dos agentes infecciosos em laboratório, como prova definitiva no diagnóstico das

mastites e análise “in vitro” da sensibilidade antimicrobiana que se faz necessária nas amostras isoladas. Entretanto, mesmo que o microrganismo patógeno seja sensível a um determinado antimicrobiano in “vitro”, isto não implica, necessariamente, no sucesso do tratamento. Por outro lado, se o microrganismo é resistente, a probabilidade de sucesso é baixa (OLIVEIRA et al., 2002).

O uso extensivo e frequentemente indiscriminado de agentes antimicrobianos na medicina e agropecuária, ou mesmo a presença de alguns compostos tóxicos no meio ambiente, tem um efeito seletivo na emergência e manutenção de resistência à droga destas bactérias, o que levou a um grande aumento da resistência a antimicrobianos na produção animal pelo mundo (FRANKLIN, 1999). A presença de resíduo de antimicrobianos no leite pode levar à ocorrência de seleção de microrganismos patogênicos resistentes e desencadear reações de hipersensibilidade (COSTA, 1999).

Evidências clínicas e microbiológicas indicam que as bactérias resistentes podem ser transmitidas a partir dos animais para o homem, resultando em infecções que são difíceis de serem tratadas, assim a seleção de um gene de resistência à droga antimicrobiana em animais de criação intensiva (frango, porco, bovino, caprino, ovino) podem aumentar a incidência de patógenos humanos de origem animal apresentando multiresistência. Tem-se observado resistência antimicrobiana de várias bactérias isoladas de porcos, galinhas, vacas como a *E.coli*, *Staphylococcus* sp, *Clostridium* sp, entre outras. A transmissão destes microrganismos para o homem resulta do contato direto com o animal, com suas fezes ou a partir da ingestão de alimentos (YOUNG, 1994; Van den BOGAARD & STOBBERING, 2000).

A ocorrência de resíduos de antibióticos no leite tem sido objeto de preocupação constante por parte das autoridades sanitárias, devido, sobretudo, aos efeitos tóxicos destes compostos sobre a saúde humana. Por este motivo, recomenda-se o monitoramento freqüente de resíduos de medicamentos e seus derivados metabólicos no leite (BOECKMAN & CARLSON, 1997). O controle de resíduos de agentes antimicrobianos no leite é particularmente importante, também, para a indústria de produtos lácteos, devido aos prejuízos causados pela

interferência destes compostos no desenvolvimento das culturas lácteas largamente empregadas em fabricas de laticínios (SPREER, 1991).

3. OBJETIVO

Os objetivos deste trabalho são:

- 1 Verificar a incidência de *E.coli* no leite coletado de vacas acometidas de mastite clínica e subclínica em 37 propriedades rurais em 2 estados brasileiros em um período de 10 meses.
- 2 Determinar a resistência das cepas isoladas frente a 12 agentes antimicrobianos.
- 3 Realizar a identificação do sorogrupo das cepas isoladas.
- 4 Verificar a presença dos genes *stx1* e *stx 2*, característicos de cepas STEC, e a presença do gene *eae* da intimina através de PCR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. 1 Animais

As amostras de leite foram fornecidas pelo Laboratório VITAFORT Indústria e Comércio de Produtos Veterinários sediado na cidade de Ribeirão Preto – SP, as mesmas foram coletadas por técnicos do mesmo laboratório, após ser efetuado o teste de CMT nos animais caracterizando mastite clínica ou subclínica.

Um total de 670 amostras de leite foram coletadas de vacas de diversas raças, em diferentes estágios de lactação, com mastite clínica ou subclínica, das quais, 51 amostras foram identificadas como *Escherichia coli*. Os animais eram criados em propriedades que utilizavam diferentes tipos de manejo, a higienização e o controle sanitário eram realizados conforme orientações do médico veterinário de cada propriedade. As amostras foram coletadas em 37 propriedades leiteiras, distribuídas em dois estados brasileiros: Minas Gerais e Rio Grande do Sul, durante os meses de fevereiro a novembro de 2004.

4. 2 Colheita do material

4.2.1 Colheita do leite através de testes utilizados no campo

Inicialmente foram identificados os animais portadores de mastite utilizando testes como o CMT e teste da caneca de fundo preto.

Nos casos de Mastite Clínica deu-se a confirmação mediante a observação da presença de sinais locais como edema, endurecimento, palpitação e aumento de temperatura do úbere; além da presença de grumos no leite submetido ao teste da caneca de fundo preto.

Os demais animais foram submetidos ao teste de CMT (Califórnia Mastite Teste), para a detecção da mastite subclínica, conforme descrito em SCHALM et al., 1971.

A detecção e o controle das mastites subclínicas tem sido o principal desafio para aqueles que trabalham com esta forma da doença. A identificação dos casos de mastite subclínica é realizada principalmente através de dois procedimentos (CÔRREA, 2003):

- 1 Detecção quantitativa da hiperleucose no leite (através da Contagem de Células Somáticas – CCS) ou qualitativamente (através do teste de CMT ou WMT – *White Mastitis Test*).

- 2 Teste microbiológico, para identificar o (s) patógeno (s) causador (es) da mastite. Este teste exige análises em laboratório, podendo ser efetuado individualmente para cada animal ou no tanque de leite.

4.2.2 Teste CMT – Califórnia Mastite Teste

O teste de CMT (SCHALM et al., 1971) foi utilizado para confirmação de casos de mastite subclínica. O kit para o teste CMT (FATEC S/A) é composto por uma bandeja padrão, com quatro cavidade, e um frasco de 500 mL de reagente, o qual consiste em um detergente aniônico associado ao corante Azul de Bromotimol.

Antes de iniciar o teste CMT, era feita uma anti-sepsia do úbere, descartava-se os dois ou três primeiros jatos de leite (teste da caneca de fundo preto) e em seguida, eram ordenhados aproximadamente 2 mL de cada quarto na cavidade da bandeja. Delicadamente, inclinava-se a bandeja, retirando o excesso de leite, em seguida adicionava-se 2 mL do reagente em cada cavidade e agitava-se vagarosamente em movimentos circulares durante aproximadamente 2 minutos. Logo após observar o grau de coagulação era realizada a comparação com o padrão para o diagnóstico.

Vários níveis de mastite foram observados com o teste de CMT nos rebanhos analisados, e a interpretação do mesmo segue descrita abaixo:

Interpretação do CMT:

1 Quando ocorreu a formação de pequenos coágulos (grumos) ou aumento na viscosidade, considerava-se uma mastite subclínica de baixo grau (+), ou seja, presumindo-se que havia entre 400.000 a 800.000 células/mL de leite.

2 Quando ocorreu a formação de grumos mais consistentes, considerava-se uma mastite subclínica de médio grau (++), ou seja, presumindo-se que havia entre 800.000 a 5000.000 células/mL de leite.

3 Quando ocorreu a formação de um gel, considerava-se uma mastite subclínica de alto grau (+++), ou seja, presumindo-se que havia mais de 5000.000 células/mL de leite (MILLER & KEARNS, 1967).

4.2.3 Colheita das amostras de leite

Inicialmente foi efetuada a higienização das mãos do retireiro e dos tetos das vacas, com uma solução de água e sabão, em seguida os tetos foram secados com papel toalha descartável. Após a higiene do local foi feita uma anti-sepsia com uma solução de álcool 70%; os primeiros jatos de leite foram descartados, a seguir, aproximadamente 5 mL de leite foram coletados em vidros esterilizados. Essas amostras foram enviadas congeladas para o laboratório de Genética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto por correio (sedex) no prazo de 3 dias.

4.3 Recepção de amostras e isolamento de linhagens bacterianas

Com auxílio de uma alça de platina as amostras foram semeadas em estrias em placas contendo Ágar MacConkey (Biobrás), e incubadas a 37°C, sendo o crescimento bacteriano avaliado após 24 e 48 horas. Cinco colônias lactose positiva e que tinham características presuntivas de *E.coli* foram submetidas aos testes bioquímicos confirmatórios. Essas colônias foram semeadas com auxílio de uma agulha de semeadura em ágar tríplice de açúcar e ferro (TSI) picando-se o meio até o fundo do tubo e fazendo estrias no ápice e incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura mostrou uma identificação presuntiva de *E.coli* com a fermentação dos três açúcares existentes no meio (lactose +, sacarose +, glicose +, com ou sem produção de gás). A fermentação desses açúcares levou a produção de ácidos e modificou a cor do TSI passando de alaranjado (cor original do meio) para amarelo; a confirmação foi realizada com a série bioquímica:

a) INDOL: é um dos produtos do metabolismo do aminoácido triptofano. As bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de degradar o triptofano com produção de indol, ácido pirúvico e amônia. O indol pode ser detectado em um meio apropriado através do desenvolvimento de uma coloração vermelha, após a adição de uma solução contendo p-dimetilaminobenzaldeído (reativo de Ehrlich ou de Kovacs). Para testar o indol, o microrganismo foi inoculado com auxílio de uma agulha de semeadura em tubos de ensaio contendo o caldo triptofano, e incubado a 37°C por 24 horas. Ao término deste período foram adicionadas 15 gotas do reativo de Kovacs pela parede do tubo. O desenvolvimento de uma cor vermelha brilhante na superfície de contato entre o reativo e o caldo triptofano indica a presença de indol.

b) LISINA: as descarboxilases são um grupo de enzimas substrato – específicas, capazes de atuar sobre a porção carboxila (COOH) dos aminoácidos, formando aminas de reação alcalinas, a lisina produz a cadaverina.

c) UREASE: os microrganismos que possuem a enzima urease têm a capacidade de hidrolisar a uréia com liberação de amônia. O teste da uréia é feito a partir de tubo inclinado, com inóculo semeado na superfície, após 24 horas de incubação a 37°C, indica a presença de uréase com a mudança de cor rosa para vermelha na superfície do ágar.

d) CITRATO DE SIMMONS: determina se um microrganismo é capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono para seu crescimento com a consequente alcalinização. O meio citrato é vertido em um tubo com ágar inclinado. Fazem-se estrias sobre a superfície inclinada do ágar, e após 24 horas de incubação a 37°C, o não crescimento da bactéria deixando o meio inalterado indicou prova negativa (KONEMAN et al., 1997).

4.4 Sorotipagem

As cepas de *E.coli* foram identificadas por meio de antígeno somático “O” (sorogrupo). Os anti-soros utilizados foram os polivalentes e monovalentes da Probac como segue:

Polivalente A: contêm anticorpos contra as *E.coli* O26, O55, O111 e O119.

Polivalente B: contêm anticorpos contra as *E.coli* O114, O125, O142 e O158.

Polivalente C: contêm anticorpos contra as *E.coli* O86, O126, O127 e O128.

Monovalentes: contêm anticorpos contra cada um dos sorogrupos anteriores, separadamente.

A fim de evitar reações cruzadas, inicialmente utilizou-se os soros polivalentes A e B, não ocorrendo aglutinação utilizou-se o soro polivalente C. Ocorrendo aglutinação em um dos polivalente, foram realizadas as provas de aglutinação usando os monovalentes correspondentes.

A pesquisa de EPEC foi considerada negativa se:

- as culturas não aglutinarem com os soros polivalentes A, B e C.
- as culturas aglutinarem em um dos soros polivalentes, mas não aglutinarem nos monovalentes correspondentes.

- a reação de aglutinação demorar mais de 2 minutos e for parcial.

4.4.1 Técnica de aglutinação em lâmina

A técnica é simples e funciona bem quando as seguintes recomendações são observadas, rigorosamente:

Placa ou lâmina de aglutinação: deve ser bem limpa e desengordura com álcool.

Proporção suspensão/anti-soro: para uma gota normal dos soros PROBAC, usar em torno da metade de uma gota da suspensão anterior.

Mistura suspensão/anti-soro: deve ser totalmente homogênea e deve ocupar uma área de 1,5 cm de diâmetro.

Movimentação da placa: movimentar a placa de modo que a mistura suspensão/soro se desloque fácil e continuamente. Manter a movimentação pelo menos por 1 a 2 minutos.

4.5 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Para a realização desse teste as cepas de *E.coli* foram repicadas em meio Mac Conkey para a obtenção de colônias jovens. Após o crescimento as colônias foram repicadas em 2 mL de infusão cérebro- coração (BHI) e colocadas em estufa a 37°C até obter escala de turvação, segundo McFarland, de 0,5 de densidade. A seguir, as culturas diluídas foram semeadas com o auxílio de swabs estéreis, em placas contendo ágar Mueller-Hinton e, após aproximadamente 3 minutos, tempo necessário para a secagem da superfície do meio, foram colocados assepticamente,

os discos (Laborclin) contendo os antimicrobianos de forma eqüidistante. A leitura foi realizada após 18 a 24 horas de incubação com uma régua milimetrada (BAUER et al., 1966; NCCLS 1999).

Os diâmetros obtidos em milímetros foram comparados com a tabela fornecida pelo fabricante dos discos utilizados.

Doze agentes antimicrobianos foram testados: ácido nalidixico (NAL-30µg); amicacina (AMI- 30µg); amoxicilina (AMO-10µg); amoxicilina + ácido clavulânico (AMC-30µg); ampicilina (AMP-10µg); cefalotina (CFL-30µg); ceftriaxona (CRO-30µg); ciprofloxacina (CIP-5µg); cotrimoxazol (SUT-25µg); estreptomocina (EST-10µg); gentamicina (GEN-10µg) e tetraciclina (TET-30µg).

4.6 Extração DNA

O DNA microbiano foi extraído segundo a técnica proposta por KESKIMAKI et al. (2001), onde uma colônia isolada de *E.coli* foi semeada por 12 horas em um tubo de ensaio contendo 1 mL de meio LB, este volume foi transferido para um tubo eppendorf e centrifugado a 14.000 rpm por 30 segundos para a precipitação das células e descarte do sobrenadante. As células precipitadas foram ressuspensas em 250 µL de água Milique estéril e agitada em vortex por 30 segundos. A cultura bacteriana foi novamente precipitada e repetido o processo de lavagem. Após duas lavagens com água Milique, o tubo eppendorf contendo a cultura foi colocado por 10 minutos na água fervente (100° C). Após esse tempo, as células foram precipitadas através de centrifugação a 14.000 rpm durante 30 segundos e do sobrenadante foi retirado uma alíquota de 150 µL a qual foi transferida para um tubo eppendorf. Este material é denominado DNA molde (DNA template) e foi utilizado como fonte de DNA na reação em cadeia da polimerase (PCR).

A amplificação do DNA bacteriano foi executada em reação, segundo o protocolo de ORDEN et al (1998), com 1U de taq polimerase, 5 µL de tampão 10X (100 mM Tris – HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 2,5 µL de cada primer (40 mM), e 10 µL de DNA molde em um volume total de 50 µL. A mistura de reação foi acrescentada 1 gota de óleo mineral. O PCR foi realizado em um termociclador (Eppendorf) a 94°C por 1 minuto (desnaturação); 55°C por 1 minuto

(anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão), encerrando por um ciclo final de 72°C por 5 minutos. 10 µL do produto amplificado foram visualizados em gel de agarose a 1,5%. Os fragmentos amplificados foram observados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio. Foi utilizado o marcador molecular ØX174 digerido com HaeIII. Como controle positivo foram usadas as cepas de *E.coli* O157:H7 produtora de VT1 + *eae*, *E.coli* J2 produtora de VT2 + *eae* cedidas gentilmente pelo Departamento de Microbiologia do IB- UNICAMP; e a cepa de *E.coli* O157:H7 (933) produtora de VT1, VT2, *eae*, cedida gentilmente pelo laboratório de Microbiologia – UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo.

Primers:

VT1a-CAGTTAATGTGGTGGCGAAG

VT1b-CTGCTAATAGTTCTGCGCATC

VT2a-CTTCGGTATCCTATCCCGG

VT2b- GGA TGC ATC TCT GGT CAT TG

Na reação da PCR foi utilizado os seguintes reagentes:

DNA template.....10,0 µL

Tampão.....5,0 µL

DTNP.....2,0 µL

Primer1.....2,5 µL

Primer2.....2,5 µL

Taq.....1,0 µL

Total.....50,0 µL

Obs: o gel utilizado na eletroforese foi o TAE 1,5% e a voltagem de 60V por 2 horas.

4.7 Reação para amplificação do gene *eae*

O PCR foi realizado segundo o protocolo de China *et al.* (1996) utilizando as condições e os primers descritos.

4.8 Meios de cultura utilizados

Ágar Mac Conkey (Biobrás)

Composição (g/L)

Peptona.....	17,00
Polipeptona.....	3,00
Lactose.....	10,00
Sais biliares.....	1,50
Cloreto de sódio.....	5,00
Ágar.....	13,50
Vermelho neutro.....	0,03
Cristal violeta.....	0,001
Água destilada.....	1 L
pH final.....	7,1

Esterilizado a 120°C por 20 minutos em autoclave.

Ágar Tríplice de Açúcar e Ferro (Triple Sugar Iron Agar) – Oxoid

Composição (g/L):

Extrato de carne.....	3,00
Extrato de levedura.....	3,00
Peptona.....	20,00
Cloreto de sódio.....	5,00
Lactose.....	10,00
Sacarose.....	10,00
Glicose.....	1,00
Citrato de ferro.....	0,30
Tiossulfato de sódio.....	0,30
Vermelho de fenol.....	q.s.
Ágar.....	12,00
pH final.....	7,4

Segundo instruções do fabricante, 65g do meio de cultura foram reidratados

com 1000 mL de água destilada e em seguida levado a fervura para dissolver completamente, posteriormente foi distribuído em tubos de vidro de 12X1 mm e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Deixando o meio solidificar na posição inclinada.

Meio de Indol

Composição (g/mL):

Caldo triptofano (triptofano a 1%)

Peptona ou digerido pancreático de caseína (tripticase)...2,00

Cloreto de sódio..... 0,50

Água destilada.....100,00 mL

pH final..... 8,0

Foram misturados todos os itens acima para obtenção do caldo triptofano a 1%, em seguida foram distribuídos aproximadamente 3,0 mL do caldo em tubos de vidro de 10X1 cm e autoclavados a 121°C por 20 minutos (KONEMAN et al., 1993).

Reativo de Kovacs

Composição (mL):

Álcool amílico ou isomílico puro..... 150,00

P-Dimetilaminobenzaldeído..... 10,00

Ácido clorídrico concentrado..... 50,00

Citrato de Simmons (Simmons Citrate Agar) – Difco

Composição (g/L):

Sulfato de magnésio..... 0,20

Fosfato de amônio monobásico..... 1,00

Fosfato dipotássico..... 1,00

Citrato de sódio..... 2,00

Cloreto de sódio..... 5,00

Ágar..... 15,00

Azul de bromotimol..... 0,08

pH final..... 6,8

Segundo instruções do fabricante, 24,2g do meio de cultura foram reidratados com 1000 mL de água destilada e em seguida levado a fervura para dissolução completa, em seguida o meio foi distribuído em tubos de vidro de 10X1 cm e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Deixando o meio solidificar na posição inclinada.

Meio Luria Bertoni (LB)

Composição (g/L):

Triptona.....	10,00
Peptona.....	10,00
Extrato de levedura.....	5,00
Cloreto de sódio.....	10,0
Água destilada.....	1 L

O pH foi ajustado para 7,0 com hidróxido de sódio. O meio foi esterilizado por autoclavagem durante 20 minutos a 1 atm de pressão. Quando utilizado em placa de Petri foi adicionado 15 g/L de ágar.

Ágar Mueller-Hinton (Mueller-Hinton Agar) – OXOID

Composição (g/L):

Infusão desidratada de carne.....	300,00
Hidrolisado de caseína.....	17,50
Amido.....	1,50
Ágar.....	17,00

Segundo instruções do fabricante, 38g do meio de cultura deverão ser dissolvidos em 1000 mL de água destilada e levados a fervura para dissolução completa, a seguir o meio foi esterilizado e autoclavado a 121°C por 20 minutos.

4.9 Conservação das cepas de *E.coli*

Após o isolamento, cada um das cepas obtidas foi conservado de duas maneiras:

1. Por meio de repique semanal em placa de Petri ou quinzenal em tubo de ágar inclinado, sempre em meio LB e conservado a 4°C em geladeira.

2. Em *freezer* a -20°C em 2 tubos de plástico de microcentrífuga contendo 50% de um crescimento bacteriano em LB líquido e 50% de uma solução de glicerol a 70%.

5. RESULTADOS

De fevereiro a novembro de 2004 foram coletadas 670 amostras de leite de vacas acometidas de mastite clínica ou subclínica, em 37 propriedades de leite de dois estados brasileiros. A partir de 7,6% (51) amostras positivas para *E. coli* foram selecionadas 231 cepas de *E. coli*, as quais foram submetidas à identificação do sorogrupo correspondente.

A sorotipagem das cepas de *E.coli* foi efetuada apenas com o antígeno somático (O) assim, foi identificado o sorogrupo específico de cada linhagem. O interesse deste projeto envolvia apenas a identificação de *E.coli* enteropatogênica, assim os anti-soros utilizados eram específicos para EPEC.

Cento e oitenta e sete cepas tiveram o seu sorogrupo identificado conforme mostrado na Tabela 1. Os doze sorogrupos EPEC clássicos foram detectados entre as cepas examinadas, sendo os sorogrupos O111 (24 isolados), O26 (22 isolados), O158 (21 isolados) e O125 (21 isolados) os mais detectados. Quarenta e quatro isolados pertenciam a outros sorogrupos e foram classificados como não identificados para os sorogrupos examinados.

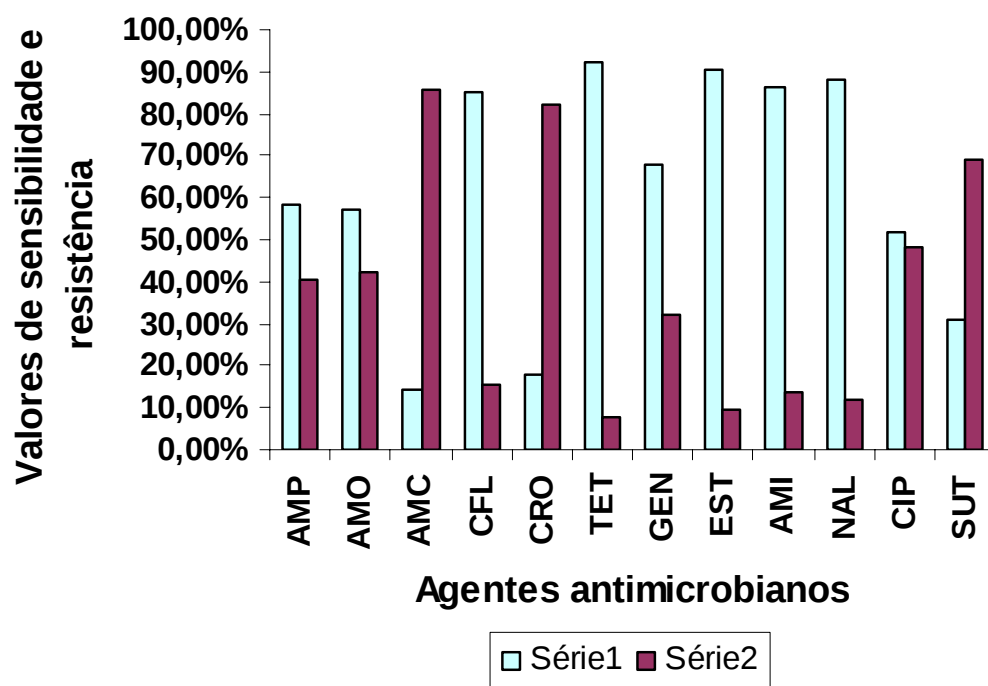
Entre as 231 cepas de *E.coli* examinadas os maiores índices de susceptibilidade detectados foram para a amoxicilina + ácido clavulânico (85,7%), ceftriaxona (82,2%) e cotrimoxazol (68,8%) conforme indicado na figura 2. Dezesesseis cepas se mostraram sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

Tabela 1. Distribuição dos sorogrupos O de 187 cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite provenientes de vacas com mastite.

Sorogrupos de <i>E. coli</i>	Número de amostras
O111	24
O26	22
O158	21
O125	21
O119	16
O86	15
O55	14
O127	13
O142	13
O114	11
O128	9
O126	8
TOTAL	187 (80,95%)

Tabela 2: Susceptibilidade de 231 cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite provenientes de vacas com mastite frente a 12 agentes antimicrobianos.

Antimicrobianos	Resistentes N (%)	Sensíveis N (%)
Ampicilina	137 (58,3%)	94 (40,7%)
Amoxicilina	133 (57,6%)	98 (42,4%)
Amoxicilina + ácido clavulânico	33 (14,3%)	198 (85,7%)
Cefalotina	196 (84,9%)	35 (15,6%)
Ceftriaxona	41 (17,7%)	190 (82,3%)
Tetraciclina	213 (92,12%)	18 (7,8%)
Gentamicina	157 (68,0%)	74 (32,0%)
Estreptomicina	209 (90,5%)	22 (9,5%)
Amicacina	200 (86,6%)	31 (13,4%)
Ácido nalidíxico	204 (88,3%)	27 (11,7%)
Ciprofloxacina	120 (51,9%)	111 (48,1%)
Cotrimoxazol	72 (31,2%)	159 (68,8%)



Série 1: resistência; série 2: sensibilidade

AMP: ampicilina, AMO: amoxicilina, AMC: amoxicilina+ácido clavulânico, CFL: cefalotina, CRO: ceftriaxona, TET: tetraciclina, GEN: gentamicina, EST: estreptomicina, AMI: amicacina, NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, SUT: cotrimoxazol..

Figura 1. Susceptibilidade de 231 cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite provenientes de vacas com mastite frente a 12 agentes antimicrobianos.

Multiresistência a duas ou mais classes de agentes antimicrobianos foi detectada em 152 cepas de *E. coli*, conforme indicado na Figura 2.

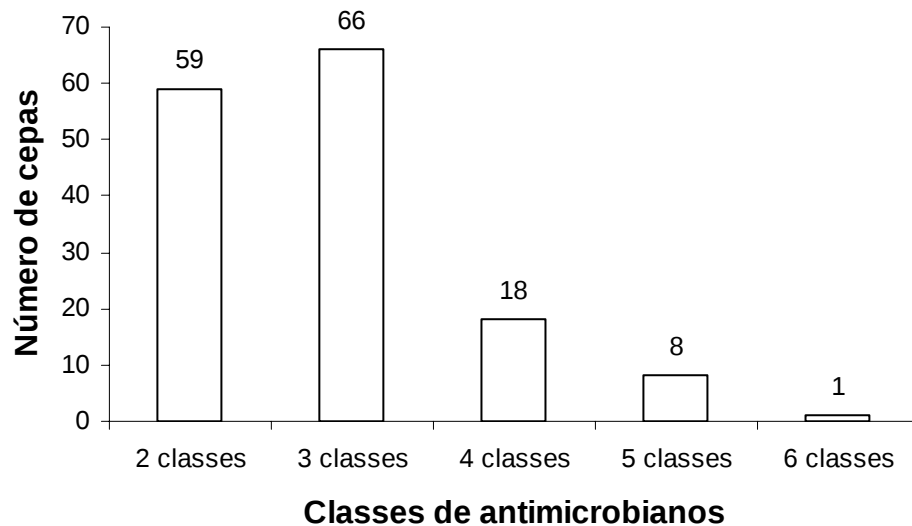


Figura 2. Distribuição da multiresistência de 152 cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico bovino.

Na Tabela 3 estão indicados os fenótipos das cepas que apresentaram resistência a 4 ou mais agentes antimicrobianos. Como pode ser verificado na tabela cada fenótipo específico foi detectado uma única vez, com exceção de um único fenótipo detectado em duas cepas, esta heterogeneidade dos fenótipos representa uma boa indicação da característica de cepas de *E. coli* como contaminantes ambientais ou patógenos oportunistas.

Tabela 3. Distribuição dos fenótipos de multiresistência de 27 cepas de *Escherichia coli* resistentes a 4 ou mais agentes antimicrobianos, em isolados provenientes de leite de vacas com mastite.

Fenótipos de resistência	Número de cepas
AMP-CFL-TET-EST	1
AMP-TET-AMI-NAL	1
CFL-TET-EST-AMI-NAL	1
AMP-AMC-CFL-TET-AMI	1
AMP-CFL-TET-GEN-EST	1
AMP-TET-GEN-AMI-NAL	1
AMP-CFL-GEN-EST-AMI-CIP	1
CRO-TET-GEN-EST-AMI-NAL	1
AMP-CFL-GEN-AMI-NAL-CIP	1
AMP-AMO-CIP-GEN-AMI-NAL	1
AMP-TET-EST-AMI-NAL-CIP	1
AMO-TET-GEN-EST-AMI-CIP	1
AMP-CFL-TET-GEN-EST-AMI	1
AMO-TET-GEN-EST-AMI-NAL	1
AMO-TET-GEN-EST-AMI-CIP	1
AMC-CFL-TET-GEN-AMI-NAL	1
AMC-CFL-TET-GEN-EST-AMI-NAL	1
TET-GEN-EST-AMI-NAL-CIP-SUT	1
AMP-AMO-TET-GEN-EST-AMI-SUT	1
AMP-AMO-CFL-GEN-EST-AMI-SUT	1
AMP-AMO-CFL-TET-EST-AMI-SUT	1
AMP-AMO-CFL-TET-EST-AMI-CIP	1
AMO-AMC-CFL-TET-GEN-AMI-NAL	1
AMP-TET-GEN-EST-AMI-NAL-CIP-SUT	2
AMP-AMO-AMC-CFL-TET-EST-AMI-NAL	1
AMP-AMO-CFL-TET-GEN-EST-AMI-CIP	1
TOTAL	27

AMP: ampicilina, AMO: amoxicilina, AMC: amoxicilina+ácido clavulânico, CFL: cefalotina, CRO: ceftriaxona, TET: tetraciclina, GEN: gentamicina, EST: estreptomicina, AMI: amicacina, NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, SUT: cotrimoxazol.

A verificação da expressão dos genes de *stx 1* e *stx 2* por PCR das 231 cepas testadas foram de 5,20% de *stx 2* e 3,46% de *stx 1* (tabela 4 e figura 2).

Tabela 4. Fatores de virulência de cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico provenientes de dois estados brasileiros no período de fevereiro a novembro de 2004.

Fatores de virulência	Número de cepas (%)	STEC
<i>stx 1</i>	8 (3.4)	+
<i>stx 2</i>	12 (5.2)	+
<i>eae</i>	2 (0.8)	*

Das 8 cepas *stx 1* positivas, 3 apresentaram multiresistência, sendo que as resistências antimicrobianas mais comuns envolviam a ampicilina, a gentamicina, o ácido nalidíxico, a amicacina e a tetraciclina. Das cepas *stx 2* positivas, 8 apresentaram multiresistência, sendo as resistências predominantes a ampicilina, a tetraciclina, a gentamicina e a estreptomicina (resultados não mostrados).

O gene *eae* foi detectado em duas cepas de *E.coli stx* negativo (figura 3).

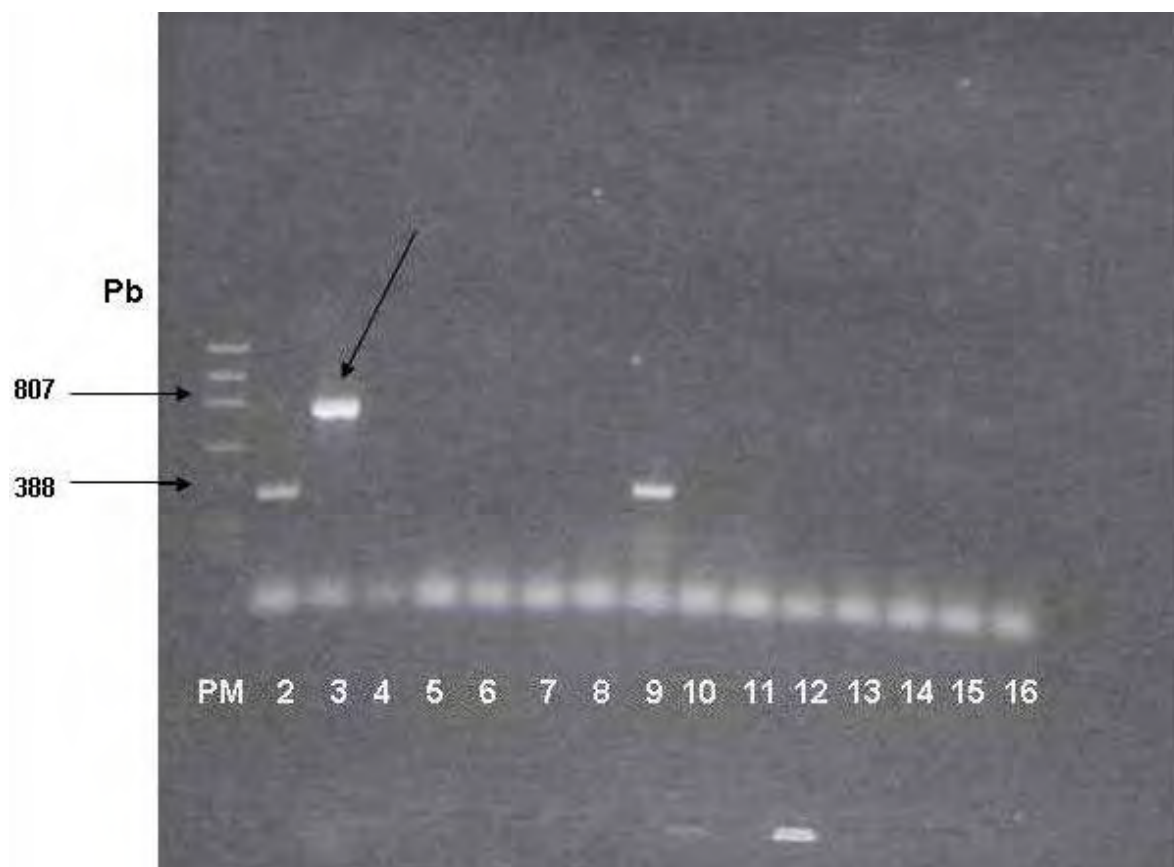


Figura 2. Eletroforese em gel TAE 1,5% de PCR para a detecção do gene stx1 e stx2 de *E.coli* isoladas de leite mastítico. Raia 1- marcador de peso molecular Øx174 digerida com Hae III; raia 2- stx1 controle positivo; raia 3- amostra 142 stx2 positivo; raia 4- amostra 119 negativa; raia 5- amostra 133 negativa; raia 6- amostra 131 negativa; raia 7- amostra 147 negativa; raia 8- amostra 121 negativa; raia 9- amostra controle positivo stx1; raia 10- amostra 122 negativa; raia 11- amostra 146 negativa; raia 12- amostra 145 negativa; raia 13- amostra 148 negativa; raia 14- amostra 149 negativa; raia 15- amostra 134 negativa; raia 16- amostra 156 negativa.



Figura 3. Eletroforese em gel TAE 1,5% de PCR para a detecção do gene *eae* de *E.coli* isoladas de leite mastítico. Raia 1- marcador de peso molecular Øx174 digerida com Hae III; raia 2- amostra 172 negativa; raia 3- amostra 173 negativa; raia 4- amostra 110 negativa; raia 5- amostra 186 *eae* positivo; raia 6- amostra 184 negativa; raia 7- amostra 192 *eae* positivo; raia 8- amostra 190 negativa; raia 9- amostra controle positivo *stx1* e *stx2*; raia 10- amostra 189 negativa; raia 11- amostra 191 negativa; raia 12- amostra 187 negativa; raia 13- amostra 185 negativa; raia 14- amostra 181 negativa; raia 15- amostra 122 negativa; raia 16- amostra 199 negativa.

6. DISCUSSÃO

A mastite tem sido reconhecida há muito tempo como a doença mais onerosa em fazendas de leite (MILLER *et al*, 1993). Baseado em estudos epidemiológicos, tem sido levantada a hipótese que as vacas leiteiras apresentam mastite clínica e subclínica por serem infectadas por cepas oportunistas de *E. coli* provenientes do seu habitat (fezes) (LIPMAN *et al*, 1995). Muitos autores defendem a ideia que bactéria, vaca e fatores ambientais são interdependentes e influenciam a susceptibilidade à mastite, sendo que muitos estudos realizados durante a última década, indicaram que a severidade da mastite provocada por *E. coli* é principalmente determinada por características específicas da vaca e não da patogenicidade das cepas bacterianas (BURVENICH *et al*, 2003). Neste sentido, DOGAN *et al* (2006) analisaram 6 linhagens de *E. coli* associadas com infecção intramamária (IMI) e através da técnica de PCR demonstraram a ausência nestas linhagens dos genes responsáveis pela codificação das fímbrias K99, F1845, CS31A, toxina termolábel (LT), toxinas termoestáveis (Stx e STb), shiga toxinas tipo 1 e 2 (stx 1 e stx 2), fator citotóxico de necrose 1 e 2 (cnf1 e cnf2), intimina (eae), fímbria P (pap), fímbria S (sfa), adesão afimbrial I (afa I), hemolisina (hly) e ipaH um gene tipicamente associado com invasão celular por *E. coli* diarréica e extraintestinal.

Neste estudo; 81,0 % das cepas de *E. coli* isoladas (187 cepas) pertencem a sorogrupos clássicos de EPEC e entre eles O26, O55, O111 e O119 representam 33,0% dos isolados (tabela 1). O isolamento de um grande número de cepas com os sorogrupos O111 e O119 representa um motivo de preocupação, pois estes sorogrupos são reconhecidos como os sorogrupos EPEC relacionados à diarreia infantil no Brasil (TOLEDO *et al*, 1983; CAMPOS *et al*, 1994). Uma vez que cepas de sorogrupos O111 e O119 foram encontradas entre as amostras analisadas de

leite mastítico, isto representa um motivo de preocupação pela possibilidade de transmissão destas cepas para humanos, uma vez que é prática comum no campo o consumo de leite in natura ou a utilização deste leite para elaboração de queijos (ARAÚJO *et al*, 2002), assim como é possível à recuperação destas cepas devido a uma elaboração defeituosa do leite pasteurizado, ou a sua contaminação após o processo de pasteurização (CARNEIRO *et al*, 2006). Estes mesmos sorogrupos também estão envolvidos com diarreia infantil na Europa (WOLF, 1997), e o sorogrupo O111 também foi isolado em pacientes com síndrome urêmica hemolítica (SCHMIDT & KARCH, 1996).

Das 279 cepas de *E. coli* investigadas por LINTON & HOWE (1979), 217 cepas (77,1%) tiveram o seu sorogrupo O identificado, 67 diferentes sorogrupos O foram identificados. Isto indica que as cepas de *E. coli* isoladas de mastite bovina não pertencem a um número limitado de linhagens patogênicas. Muitos outros autores também descreveram o isolamento de um grande número de sorogrupos distintos entre as cepas de *E. coli* isoladas de mastite bovina (WELLS *et al*, 1991; WILSON *et al*, 1992; WIELER *et al*, 1996). Entretanto, de maneira geral os sorogrupos geralmente associados à mastite bovina O5, O8, O20, O76, O113, O118, O145 e O146 são sorogrupos isolados de gado os quais são diferentes dos sorogrupos mais isolados na espécie humana, embora algumas vezes os sorogrupos O26 e O111 associados a doenças em humanos também foram isolados em gado saudável e diarreico (HOLLAND *et al*, 1999, CORREA & MARIN, 2002, GAMEZ *et al*, 2006).

A prevalência e a extensão da resistência a agentes antimicrobianos em uma população estão fortemente correlacionadas com o uso de antibióticos e com a seleção e disseminação de bactérias resistentes às quais estão muito aumentadas devido à pressão seletiva exercida pelo antibiótico. Como uma consequência desta relação, a resistência é mais comum em locais onde ocorre um uso mais amplo de antibióticos. Assim, fazendas de criação intensiva de animais representam um grande reservatório de bactérias contendo genes de resistência a antibióticos (MURRAY, 1992). Neste caso a resistência é selecionada e perpetuada, não somente pelo uso regular de antibióticos com fins terapêuticos, mas também pelo acréscimo de antimicrobianos como fator de crescimento para os animais, pouco

comum em bovinos (Van den BOGAARD *et al.*, 2000; TEUBER, 2001). Nesta situação os microrganismos resistentes são facilmente disseminados dentro das fazendas através das fezes, promovendo contaminação da água utilizada pelos animais ou do meio ambiente. A preocupação é que bactérias portando genes de resistência a antimicrobianos, patogênicas ou não patogênicas para os seres humanos, sejam selecionadas na microbiota intestinal dos animais e que contaminem os alimentos de origem animal e transfiram sua resistência para outras bactérias da mesma espécie ou não no intestino humano (DONNELLY *et al.*, 1996; BYMATER *et al.*, 2004). Já existem fortes evidências de que resistências encontradas em bactérias isoladas dos alimentos representam a fonte potencial de resistência para patógenos humanos (SCHWARTZ, *et al.*, 2001; WISE & SOULSBY, 2002).

Entre as 187 cepas de *E. coli* testadas foi encontrado um alto índice de susceptibilidade antimicrobiana apenas para amoxicilina + ácido clavulânico (85,7%), ceftriaxona (82,2%) e cotrimoxazol (68,8%).

ZHAO *et al.* (2001) examinaram 50 cepas de *E. coli* produtoras de shiga toxina (STEC) sendo 29 cepas O157 e 21 cepas não O157 e encontraram um alto índice de resistência para ampicilina, tetraciclina e estreptomicina o que coincide com o presente trabalho (Tabela 2). Esses antimicrobianos tradicionalmente apresentam altos níveis de resistência em *E.coli* isolada de bovino (BERGE *et al.*, 2003; GUERRA, *et al.*, 2003; LEHTOLAINEN *et al.*, 2003). Também descreveram que 78,0% das cepas isoladas exibiam resistências a dois ou mais agentes antimicrobianos, sendo mais encontrada a resistência múltipla a estreptomicina, tetraciclina e sulfametaxazol. Também no presente trabalho foi encontrado um alto índice de multiresistência a dois ou mais antimicrobianos (65,8%), sendo que 11,6% destas cepas exibiram resistência a 4 ou mais antimicrobianos (Figura 1), e coincidentemente também foram recuperadas muitas cepas apresentando resistência múltipla a estreptomicina, tetraciclina e sulfametaxazol (Tabela 3). PETRI & ANTUNES (1989) trabalharam com alimento de origem animal e verificaram contaminação por *E.coli*, entre 100 amostras analisadas, sendo que a resistência antimicrobiana foi de 68,75% para ampicilina e 43,75% para a tetraciclina, e 31,25% das cepas apresentaram multiresistência. Isto indica que a

comida de origem animal pode tornar-se veículo potencial de linhagens patogênicas de *E.coli* para o homem.

SCHROEDER *et al.*, (2002) isolaram 133 cepas de *E.coli* de gado e encontraram a maior resistência para a tetraciclina (20%), e também observaram multiresistência, envolvendo a combinação de dois antimicrobianos, semelhante ao que foi encontrado neste trabalho.

Na Europa é possível encontrar duas situações distintas, países que não exercem um rígido controle sobre o comércio de antimicrobianos como a Espanha e países com um rígido controle como Suécia e Dinamarca. ORDEN *et al* (2000) examinaram 195 cepas de *E. coli* provenientes de vacas diarreicas na Espanha e também verificaram um alto nível de resistência a ampicilina, tetraciclina, estreptomicina e trimetopim, o que coincide com o presente trabalho (Tabela 2) e também descreveram um alto índice de cepas multiresistentes (76,9%). Neste trabalho 67,7% das cepas foram resistentes a 4 ou mais antimicrobianos (Figura 1). Por outro lado LANZ *et al* (2003) examinaram na Suécia 581 cepas de *E. coli* frente a 16 drogas antimicrobianas e encontraram níveis discretos de resistência a ampicilina (21,0%), estreptomicina (22,0%) e tetraciclina (20,0%) e total susceptibilidade aos demais agentes testados, sendo que em torno de 80,0% das cepas analisadas apresentavam susceptibilidade a todos os agentes testados.

No Brasil LANGONI *et al* (2000) descreveram discretos níveis de resistência para tetraciclina (13,0%) e ampicilina (12,0%) entre as cepas de *E. coli* examinadas provenientes de mastite bovina, enquanto que AMARAL *et al* (1996) descreveram também para cepas provenientes de mastite bovina índices de resistência de 92,9% para a ampicilina e 71,4% para a tetraciclina. Neste sentido, os dados obtidos neste trabalho estão mais próximos daqueles descritos por BAPTISTA & MARIN (2006) para cepas de *E. coli* isoladas de vacas, diarreicas e mastíticas que apresentaram nível intermediário entre os valores acima citados.

WHITE *et al.* (2002), demonstraram que o nível de resistência em cepas patogênicas está aumentado. Os primeiros isolados clínicos de O157:H7 eram sensíveis a muitos antimicrobianos e a resistência a antibióticos era incomum nestes isolados. Em 1988, RATNAM *et al.* verificaram que apenas 2,9% de 174 cepas de *E.coli* O157 examinadas eram resistentes a um antimicrobiano. MENG *et al.* (1998),

descreveram que 24,0% das 125 cepas de *E.coli* O157 isoladas de animais, alimentos e humanos apresentaram resistência a no mínimo um antibiótico e 19,0% eram resistentes a três ou mais antimicrobianos. Uma vez que antimicrobianos não são utilizados para o tratamento de infecção por O157 em humanos, pode-se supor que o aumento desta resistência pode ser devido ao uso de antimicrobianos no gado, o qual é considerado um reservatório natural para a O157 (WHITE, *et al.*, 2002).

Embora o nível de resistência aos antimicrobianos possa refletir o uso destes agentes na prevenção ou tratamento da mastite bovina, alguns autores defendem a hipótese que existe uma ausência de evidências concretas que o uso destes agentes tem resultado no aumento de resistência a estes agentes antimicrobianos (HILLERTON & BERY, 2005). Em estudos realizados nos Estados Unidos, não existem indicações de um aumento de resistência aos agentes que são comumente utilizados no tratamento de mastites no gado leiteiro (ERSKINE *et al*, 2001; MAKOVEC & RUEGG, 2003). Na Suíça não foi detectado aumento no nível de resistência dos patógenos responsáveis por mastite bovina nos últimos 20 anos (CORTI *et al*, 2003 in ROESCH *et al*, 2006), assim existem pontos de vista diferentes sobre o mesmo tema. Um maior controle e acesso aos dados relacionados à resistência a agentes antimicrobianos apresentada pelos patógenos responsáveis pelas mastites bovinas se fazem necessários em relação ao Brasil para que possamos assumir uma das hipóteses apresentadas anteriormente.

O gado tem sido descrito como o principal reservatório de cepas de STEC incluindo o sorotipo O157:H7 (PATON & PATON, 1998). Entretanto, mais de 200 sorotipos diferentes de STEC são isolados do gado, sendo alguns sorotipos isolados mais frequentemente do que outros (BEUTIN *et al.*, 2004, CAPRIOLI *et al.*, 2005). No Brasil, existem poucos estudos sobre o isolamento e as características de STEC no gado (CERQUEIRA *et al.*, 1999; SALVADORI *et al*, 2003; LEOMIL *et al.*, 2003; IRINO *et al.*, 2005), sendo a maioria para gado saudável e diarréico. LIRA *et al.* (2004) isolaram cepas de STEC de leite mastítico, e encontraram o gene *stx* em 12,08% das amostras, sendo 22,7% para *stx1* e 45,5% *stx2*. No presente estudo, a detecção do gene *stx* foi em 12,3% das cepas de *E.coli*, distribuídas em 40% e 60% para *stx1* e *stx2*, respectivamente, com a predominância do gene *stx2* em ambos os

estudos. Este estudo coincide com o trabalho de HORNITZKY *et al.* (2002) na Austrália, ZSCHOCK *et al.* (2000) na Alemanha e IRINO *et al.* (2005) no Brasil.

205 amostras de *E.coli* de bezerros diarréicos foram examinadas quanto à presença do gene *stx1* e *stx2*. O gene *stx1* foi detectado em 9,7% e o *stx2* em 6,3% (SALVADORI *et al.*, 2003). IRINO *et al.* (2005), isolaram amostras de *E.coli* e detectaram o gene *stx1* e *stx2* em 56.4% das cepas e apenas o *stx2* em 40.6% dos isolados. Também observaram a presença do gene *eae* apenas em dois isolados.

Em 2003, LEOMIL *et al.*, isolaram 344 amostras de *E.coli* provenientes de gado diarréico e não diarréico, e detectaram o gene *stx1* em 12 isolados, *stx2* em 4 e ambos os genes em 8 cepas.

O gene *eae* é responsável pelas lesões attaching - effacing, semelhante à lesão produzida pela EPEC (GANNON *et al.*, 1993). Neste estudo, o gene *eae* não foi detectado nas cepas de STEC isoladas. A baixa prevalência de STEC *eae* positivo tem sido descrito em vários trabalhos (BEUTIN *et al.*, 1993; ZSCHOK *et al.*, 2000; IRINO *et al.*; 2005). Entretanto, neste estudo uma pequena porcentagem de cepas de *E.coli* (1,0%) foram *eae* positivo. Este trabalho não coincide com LEOMIL *et al.* (2003), onde o gene *eae* foi detectado em 41.6% das cepas de *E.coli* isoladas. ORDEN *et al.* (1998), investigaram 43 amostras de STEC de vários sorogrupos e encontraram 69,8% de amostras *stx1* positivo e 20,9% de *stx2* positivo.

COBBOLD *et al.* (2000), isolaram *E.coli* de bovinos as quais apresentaram *stx* positivo em 7% das vacas produtoras de leite e 12,7% dos bezerros e relacionaram a presença de VTEC nas cepas de *E.coli* a vários fatores predisponentes como o habitat, alimentação, sistema, imunológico deprimido, estresse, dieta, particularidades do leite, trato gastrointestinal, entre outros, relacionados ao gado bovino.

Em 2002, SCHROEDER *et al.*, isolaram cepas de *E.coli* de animais e humanos e as amostras de vaca apresentaram maior resistência antimicrobiana para a estreptomicina (50%) e para a tetraciclina (47%). Entre todas as amostras isoladas, foi demonstrada presença de STEC em 26% das cepas, sendo 89% de *stx* 1 e 2% *stx* 2, diferente deste trabalho, onde a presença de *stx* 1 e *stx* 2 foram de 3,46% e 5,20%, respectivamente. Comparando as cepas provenientes de gado com presença de *stx* e outras classes de *E.coli*, respectivamente, os autores puderam

concluir que há similaridade de resistência antimicrobiana em relação a quase todos os antimicrobianos testados, com exceção da ampicilina (26% - 8%), cefalotina (14% - 3%). Eles concluíram que quando existe uma infecção bacteriana nos bovinos, a escolha do uso de um antimicrobiano não depende do tipo de bactéria que está presente. Sendo assim, a resistência antimicrobiana de VTEC quando comparada a outras classes de *E.coli* mostrou-se similar às cepas comensais.

MOREIRA *et al.* (2003), investigaram a produção de *stx* 1127 cepas de *E.coli* isoladas de 243 vacas leiteiras mantidas em 60 pequenas propriedades. Cepas STEC foram encontradas em 95% das fazendas e em 49% dos animais pesquisados.

BAPTISTA & MARIN (2006) isolaram 150 cepas de *E.coli* provenientes de vacas mastíticas, sadias e bezerros diarréicos, e observaram a presença de *stx* 2 em todos os tipos de gado analisados, sendo 5 cepas de vacas com mastite. Mas não foi encontrada nenhuma cepa *stx* 1 positivo.

O estudo das infecções por STEC, com fins clínicos e epidemiológicos, tem hoje grande relevância, sobretudo em países em desenvolvimento, onde as condições de saneamento ambiental não são boas e controle de qualidade microbiológica dos alimentos não é rigoroso (REYES *et al.*, 2004).

7. CONCLUSÕES

1. No presente estudo foi detectado a presença *Escherichia coli* em 7,6% das amostras de leite materno.

2. As cepas de *E.coli* isoladas apresentaram um alto nível de resistência aos antimicrobianos testados. Também apresentaram um elevado número de multiresistência.

3. Entre as cepas de *E.coli* analisadas foi detectado os sorogrupos O111 e O119 que são importantes patógenos para os seres humanos, estando associados à diarreia infantil no Brasil.

4. Os genes *stx1*, *stx2* e *eae* foram detectados em 22 cepas de *E.coli* isoladas de leite materno, sendo 8 (3.4%) cepas *stx1* positivo, 12 (5.2%) *stx2* positivo e 2 (0.8%) cepas *eae* positivo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L.A.; NADER-FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; PENHA, L.C.A. Ação de antibióticos e quimioterápicos sobre alguns agentes bacterianos da mastite bovina, isolados da água utilizada no processo de obtenção do leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, p. 525-32, 1996.

ANGULO, F.J.; JOHNSON, K.; TAUXE, R.V.; COHEN, M.H. Significance and sources of antimicrobial - resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. **Microbiology Drug Research**, v.6, p.77-83, 2000.

ARAUJO, V.S.; PAGLIARES, V.A.; QUEIROZ, M.L.P.; FREITAS-ALMEIDA, A.C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.1172-7, 2002.

BAPTISTA, A.; MARIN, J.M. In vitro susceptibility to 11 antimicrobial agents of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and mastitic cattle in São Paulo State, Brazil. **ARS VETERINARIA**, v.22, p.31-6, 2006.

BAUER, A.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-6, 1966.

BERGE, A.C.B; ATWILL, E.R.; E.R.; SISCHO, W.M. Assessing antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* in young calves using cluster analysis techniques. **Preventive Veterinary Medicine**, v.61, p.91-102, 2003.

BETTELHEIM, K.A.; KUZEVSKI, R.A.; KRAUSE, D.O.; MCSWEENEY, C.S. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.699-709, 2005.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMAN, S.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) - producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.2483-88, 1993.

BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; KAULFUSS, S.; GLEIER, K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.1099-1108, 2004.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALLONSO, M.P.; GONZALEZ, E.A.; BERNARDEZ, M.I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (Verotoxin) - producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae ϵ). **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.645-51, 2004.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. **Clínica Veterinária**, 7ª Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, cap.15, p. 424-63, 1991.

BOECKMAN, S.; CARLSON, K.R. Milk and dairy beef residue prevention protocol. **Arlington: Agri-Education**, 1997.

BRAMLEY, A.J.; COLLOR, J.S.; ERSKINE, R.J. Current concepts of bovine mastitis. **Madison: National Mastitis Council**, 4ª Ed., p. 694, 1996.

BRITO, J.R.F.; BRESSAN, M. Controle integrado da mastite bovina. Juiz de Fora: **Embrapa-CNPGL**, p.97-111, 1996.

BURVENICH, C.; VAN MERIS, V.; MEHRZAD, J.; DIEZ-FRAILE A.; DUCHATEAU, L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cows factors. **Veterinary Research**, v.34, p.521-64, 2003.

BYWATER, R.; DELUYKER, H.; DEROOVER, E.; de JONG, A.; MARION, H.; McCONVILLE, M.; ROWAN, T.; SHRYOCK, T.; SHUSTER, D.; THOMAS, V.; VALLE, M.; WALTERS, J. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and comensal bacteria isolated from food-producing animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p.744-54, 2004.

CAMPOS , L.C.; WHITTAM, T.S.; GOMES, T.A.T.; ANDRADE, J.R.S.; TRABULSI, L.R. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **Journal of Infectious Diseases**, v.62, p.3282-8, 1994.

CAMPOS, L.C. Conventional methods for the diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli* infections. **Revista de Microbiologia**, v.27, p.1-6, 1996.

CAPRIOLLI, A.; BUSANI, L.; MARTEL, J.L. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.295-301, 2000.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v.36, p.289-311, 2005.

CARNEIRO, L.A.M.; LINS, M.C.; GARCIA, F.R.A.; SILVA, A.P.S.; MAULER, P.M.; ALVES, G.B.; ROSA, A.C.P.; ANDRADE, J.R.C.; FREITAS-ALMEIDA, A.C.; QUEIROZ, M.L.P. Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* strains serogroupe as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from pasteurized milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.15-21, 2006.

CERQUEIRA, A.M.F.; GUTH, B.E.C; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R.C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.70, p.111-21, 1999.

CHALMERS, R.M.; AIRD, H.; BOLTON, F.J. Waterborne *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.124-32, 2000.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence – associated genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.92, p.3462-5, 1996.

COBBOLD, R.; DESMARCHELIER, P.A. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v.71, p.125-37, 2000.

COBBOLD, R.; DESMARCHELIER, P. Horizontal transmission of shiga toxin-producing *Escherichia coli* within groups of dairy calves. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.8, p.4148-51, 2002.

COHEN, M.L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v.406, p.762-7, 2000.

CORRÊA, M.G.P. Análise microbiológica, sorológica e molecular de linhagens de *Escherichia coli* isoladas de leite obtido de vacas com mastite. 2000. 93f. Dissertação de Mestrado - FCAV, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

CORRÊA, M.G.P.; MARIN, J.M. O-serogroups, eae gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.85, p.125-32, 2002.

CORRÊA, I. Resistência a drogas antimicrobianas de cepas de *Staphylococcus coagulase-positiva* isoladas de leite mastítico bovino. Dissertação de Mestrado - FCAV, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

COSTA, E. O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.44, p.15-17, 1996.

COSTA, E. O.; RAIA, R. B.; GARINO JÚNIOR, F.; WATANABE, E. T.; RIBEIRO, A. R.; GROFF, M. R. Presença de resíduos de antibióticos no leite de pequena mistura de propriedades leiteiras. **Revista Nappama**, São Paulo, v.2, n.1, p.10-3, 1999.

CRAY JR., W.C.; THOMAS, L.A.; SCHNEIDER, R.A.; MOOM, H.W. Virulence attributes of *Escherichia coli* isolated from dairy heifer feces. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.369-74, 1996.

DOGAN, B.; KLAESSIG, S.; RISHNIW, M.; ALMEIDA, R.A.; OLIVER, S.P.; SIMPSON, K.; SCHUKKEN, Y.H. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.116, p.270-82, 2006.

DONNELLY, J.P.; VOSS, A.; WHITE, W.; MURRAY, B.E. Does the use in animals of antimicrobial agents, including glycopeptide antibiotics influence the efficacy of antimicrobial therapy in humans? **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.37, p.389-92, 1996.

DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.289-302, 1991.

EBERHART, R.J.; HAMON, R.J.; JASPER, D.E.; NATZKE, R.P.; NICKERSON, S.C.; RENEAU, J.H.; SMIT, K.L. Conceptos actuales de mastitis bovina. **Consejo Nacional de Mastitis**, 1840 Wilson Blvd. Arlington, V.A., 3ª. Ed., p. 22-301, 1990.

EBERHART, R.J.; NATZKE, R.P.; NEWBOULD, F.H.S.; NONNECKE, B.; THOMPSON, P. Coliform mastitis - A review. **Journal Dairy Science**, v.62, p.1-22, 1979.

ELDER, R.O. KELL, J.E. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides and carcasses of beef cattle during processing. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, v.97, p.2999-3003, 2000.

ELLIOTT, S.J., et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Molecular Microbiology**, v.28, p.1-4, 1998.

ERSKINE, R.J.; WALKER, R.D.; BOLIN, C.A.; BARLETT, P.C.; WHITE, D.G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1111-8, 2001.

FRANKEL, G., et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v.30, p.911, 1998.

FRANKLIN, A. Current status of antibiotic resistance in animal production. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.92, p.23-8, 1999.

GAMEZ, H.A.; RIGOBELLO, E.C.; FERNANDES, S.A.; MARIN, J.M.; ÁVILA, F.A. Diarréia bovina: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados de bezerros da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **ARS VETERINÁRIA**, v.22, p.22-30, 2006.

GANNON, V.P.J.; RASHED, M.; KING, R.K.; GOLSTEYN, T.E.J. Detection and characterization of eae gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.1268-74, 1993.

GUERRA, B.; JUNKER, E.; SCHOETRE, A.; MOLORNY, B.; LEHMANN, S.; HELMUTH, R. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.489-92, 2003.

HACKER, J.; KAPPER, J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes.

Annual Review of Microbiology, v.54, p.641-79, 2000.

HILLERTON, J.E.; BERY, E.A. Treating mastitis in the cow-a tradition or an archaism. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1250-5, 2005.

HOLLAND, R.E.; WILSON, R.A.; HOLLAND, M.S.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MULLANEY, P.; WHITE, D.G. Characterization of *eae*⁺ *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves. **Veterinary Microbiology**, v.66, p. 251-63, 1999.

HORNITZKY, M.A.; VANSELOW, B.A.; WALKER, K.; BETTELHEIM, K.A.; CORNEY, B.; GILL, P.; BAILEY, G.; DJORDJEVIC, S.P. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy Australian cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.6439-45, 2002.

IRINO, K; KATO, M.A.M.F.; VAZ, T.M.I; RAMOS, I.I.; SOUZA, M.A.C.; CRUZ, A.S.; GOMES, T.A.T; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.29-36, 2005.

JAWETS, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. Bastonetes Gram-negativos e entéricos (enterobacteriaceae). In: BROOKS, G.F.; BUFEL, J.S.; MORSE, S.A. (edit.). **Microbiologia Médica**. 21^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.16, p.175-84, 2000.

JENKINS, C., et al. Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1775-8, 2003.

KAPPER, J.B.; RODRIGUES, J.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; TRABULSI, L.R. Proceedings of the intestinal Symposium on enteropathogenic *E.coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.2, p.15-38, 1995.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; STEELE, B.T. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uremic syndrome and haemorrhagic colitis. **Lancet**, p.1299-1300, 1983.

KARMALI, M.A. Infection by verocitotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v.2, p.15-38, 1989.

KESKIMAKI, M.; MATTILA, L.; PELTOLA, H.; SIITONEN, A. EPEC, EAC and STEC in stool specimes: Prevalence and molecula epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, n.40, p.151-6, 2001.

KONEMAM, E.W.; ALLEN, S.D.; SCHREKENBERGER, P.; JANDA, C.; WINN, W.C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**, 5 ed. Philadelphia, Lippincott Company, 1997.

KONOWALCHUC, J.; SPEIRS, J.L.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection an Immunity**, 1977.

KRISHNAN, C.; FITZGERALD, V.A.; DAKIN, S.J.; BEHME, R.J. Laboratory investigation of outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p.1043-7, 1987.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the enviromental. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.107-17, 2000.

LANGONI, H.; ARAÚJO, W.N.; SILVA, A.V.; SOUZA, L.C. Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacin bem como a sua associa  o. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 67, p. 177-80, 2000.

LANGONI, H.; da SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos da flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina**

Veterinária, v.20, p.204-9, 1998.

LANZ, R.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P. Antimicrobial resistance and resistance gene determination in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v.91, p.73-84, 2003.

LEHTOLAINEN, T.; SHWIMMER, A.; SHPIGEL, N.Y.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; PYORALA, S. In vitro antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from clinical bovine mastitis in Finland and Israel. **Journal Dairy Science**, v.86, p.3927-32, 2003.

LEOMIL, L.; AIDAR-UGRINOVICH, L.; GUTH, B.E.C.; IRINO, K.; VETTORATO, M.P.; ONUMA, D.L.; CASTRO, A.F.P. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.97, p.103-9, 2003.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **Journal of Infectious Disease**, v.155, p.377-89, 1987.

LEVY, S.B. The antibiotic Paradox. **How the misuse of antibiotics destroys their curative powers**. 2^a. Ed. Perseus Publishing, Cambridge, MA 2002.

LINTON, A.H.; HOWE, K.A. A note on the range of *Escherichia coli* O-serotypes causing clinical bovine mastitis and their antibiotic resistance spectra. **Journal of Applied Bacteriology**, v.46, p.585-90, 1979.

LIPMAN, L.J.A., de NIJS, A., LAM, T.J.G.M., GAASTRA, W. Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. **Veterinary Microbiology**, v.43, p.13-19, 1995.

LIRA, W.M.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. **Journal Applied Microbiology**, v.97, p.861-6, 2004.

McDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.1664-8, 1995.

MAKOVEC, J.A.; RUEGG, P. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8905 samples (1994-2001). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.222, p. 1582-9, 2003.

MARGATHO, L.F.F.; HIPÓLITO, M.; KANETO, C.N. Métodos de prevenção, controle e tratamento da mastite bovina. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 9, p. 5-35, 1998.

MENG, J.; ZHAO, S.; DOYLE, M.P.; JOSEFH, S.W. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157: NM isolated from animals food and humans. **Journal Food Protection**, v.6, p.1511-4, 1998.

MILLER, D.D.; KEARNS, J.V. Effectiveness of the California Mastitis Test as a measurement of the leucocyte content of quarter samples of milk. **Journal Dairy Science**, v.50, n.5, p.683-6, 1967.

MILLER, G.Y.; BARLETT, P.C.; LANCE, S.E.; ANDERSON, J.; HEIDER, L.E. Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, p.1230-6, 1993.

MOON, H.W.; WHIPP, S.C.; ARGENZIO, R.A.; LEVINE, M.M.; GIANELLA, R.A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v.41, p.1340-51, 1983.

MOREIRA, C.N.; PEREIRA, M.A.; BROD, C.S.; RODRIGUES, D.P.; CARVALHAZ, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Shiga toxin *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.93, p.179-83, 2003.

MURRAY, B.E. Problems and dilemmas of antimicrobial resistance. **Pharmacotherapy**, v.12, p. S86-S93, 1992.

NASCIMENTO, M.R. & STAMFORD, T.L.M. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **Higiene Alimentar**, v.14, n.70, p.32-5, 2000.

NATARO, J.B.; DENG, Y.; MANEVAL, D.R.; GERMAN, A.L.; MARTIN, W.C.; LEVINE, M.M. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to Hep-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v.60, p.2297-2304, 1992.

NATARO, J.B.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.142-201, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY. **Performance Standards for antimicrobial disk dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals approved Standard M31A, v. 19, n.11**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, P.A., 1999.

O'BRIEN, A.D.; LA VECK, G.D. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* like toxin produced by *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.40, p.675-83, 1983.

OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, R.A.; SOUZA, M.I. de SÁ, M.E.P. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro frente a amostras de *Staphylococcus* spp isolados de mastite subclínica bovina, no agreste meridional de Pernambuco. **A hora Veterinária**, v.22, n.127, p.8-10, 2002.

ORDEN, J.A.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; CID, D.; GARCIA, S.; SANZ,R.; de LA FUENTE, R. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *eae*-positive non-VTEC in 1 – 30 days-old diarrhoeic dairy calves. **Veterinary Microbiology**, v.63, p.239-48, 1998.

ORDEN, J.A.; RUIZ-QUITERIA, J.A.; GARCIA, S.; CID, D.; DE LA FUENTE, R. In vitro susceptibility of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic dairy calves to 15 antimicrobial agents. **Journal of Veterinary Medical Bulletin**, v.47, p.329-35, 2000.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. **Clinical Microbiology Review**, v.11, p.450-79, 1998.

PETRI, C.M.; ANTUNES, L.A.F. *Escherichia coli* em produtos cárneos comercializados em Londrina - PR. Frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC). **Revista de Microbiologia**, v.20, n.4, p.421-6, 1989.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Mastitis: counter attack. **Lousiana Agricultural Experiment station: Babson Bros. Co.**, cap.01, p.3-7, 1991.

RATNAM, S.; MARCH, S.B.; AHMED, R.; BEZANSON, G.S.; KASATIYA, S. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. **Journal Clinical Microbiology**, v.26, n.10, p.2006-12, 1998.

REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para o controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.6, p.651-8, 2003.

REYES, M.S.; DURÃN, C.; PRADO, V.J.; Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de *E.coli* produtoras de Shiga toxina (STEC) aisladas de infecciones humanas y de alimentos. **Revista Médica del Chile**, v.132, p.1211-1216, 2004.

RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S.; FERREIRA, A.J.P.; SILVA, A.S.; DELLA COLLETA, H.H.H. Fator necrosante citotóxico em *Escherichia coli* isolada de mastite clínica bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v.54, p.648-50, 2002.

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.; McGEE, H.B.; WELLS, J.; DAVIS, B.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.; HARGRETT, N.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, v.308, p.681-5, 1983.

ROESCH, M., PERRETEN, V., DOHERR, M.G., SCHAEAREN, W., SCHALLIBAUM, M., BLUM, J.W. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.989-97, 2006.

SALVADORI, M.R.; VALADARES, G.F.; LEITE, D.S.; BLANCO, J.; YANO, T. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v.34, p.230-5, 2003.

SANTOS, MV. Contagem de células somáticas e qualidade do leite e derivados. In: Simpósio Internacional sobre Produção Intensiva de Leite, 5, 2001, Belo Horizonte. **Anais São Paulo: Instituto Fernando Costa**, p.115-127, 2001.

SCHALM, O.W.; CARROL, E.J.; JAIN, N.C. Bovine mastitis. **Philadelphia: Lea & Febiger**, cap.11, p.249-82, 1971.

SCHROEDER, C.M.; MENG, J.; ZHAO, S.; DebRoy, C.; TORCOLINI, J.; ZHAO, C.; McDERMOTT, P.F.; WAGNER, D.D.; WALKER, R.D.; WHITE, D.G. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O128 and O145 from animals and humans. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.12, p.1409-14, 2002.

SCHWARTZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in

veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, p.432-7, 2001.

SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R.; ROWE, B. Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157. **Lancet**, p.885-6, 1985.

SERIWATANA, J.; ECHEVERRIA, P.; TAYLOR, D.N. Type II enterotoxin-producing *Escherichia coli* from animals and humans. **Infection and Immunity**, v.56, p.1158-61, 1988.

SILVA, Z.N.; CUNHA, A.S.; LINS, M.C.; CARNEIRO, L.A.; ALMEIDA, A.C.F.; QUEIROZ, M.L.P. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista Saúde Pública**, p.375-9, 2001.

SMITH, H.K.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S. Enviromental mastitis: cause, prevalence, prevention, **Journal of Dairy Science**, v.68, p.1531-53, 1985.

SCHMIDT, H.; KARCH, H. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic- uremic syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.10, p.2364-7, 1996.

SOLOMON, E.B.; YARON, S.; MATTHEWS, K.R. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.68, p.397-400, 2002.

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Symposium: Bovine immunology. Immunology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1851-65, 1997.

SPREER, E. Lactologia industrial. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1991.

STEVENS, M.P.; van DIEMEN, P.M.; DZIVA, F.; JONES, P.W.; WALLIS, T.S. Options for the control of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in ruminants. **Microbiology**, v.148, p.3767-78, 2002.

STROCKBINE, N.A.; JACKSON, M.P.; SUNG, L.M.; HOLMES, R.K.; O'BRIEN, A.D. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. **Jornal of Bacteriology**, v.170, n.3, p.1116-22, 1988.

SUMMERS, A.O. Generally overlooked fundamentals of bacteria genetics and ecology. **Clinical Infectious Diseases**, v.34, p.S85-S92, 2002.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v.4, p.493-9, 2001.

TOLEDO, M.R.F., ALVARIZA, M.C.B., MURAHOVSECHI, J., RAMOS, S.R.T.S., TRABULSI, L.R. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infection and Immunity**, v.39, p.586-9, 1983.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**, 3^a. ed., Editora Atheneu, Rio de Janeiro, p.586, 2002.

Van den BOGAARD, A.E; STOBBEINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Link between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.327-35, 2000.

WALTON, J.R.; SMITH, D.H. New hemolysin (gama) produced by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.98, p.304-5, 1969.

WANG, G.; ZAO, T.; DOYLE, M.P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faces. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.62, n.7, p.2567-70, 1996.

WATANABE, D.S.A; DECARLIS, R.M.S.T.; MICHELIN, L.A.; MONTELLI, A.C. Fatores de virulência de amostras urinárias de *Escherichia coli*. **Revista Microbiológica**, v.19, p.123-8, 1988.

WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.16, p.41-66, 1988.

WELLS, J.G., SHIPMAN, L.D., GREENE, K.D., SOWERS, E.G., GREEN, J.H., CAMERON, D.N., DOWNES, F.P., MARTINI, M.L., GRIFFIN, P.M., OSTROFF, S.M., POTTER, M.E., TAUXE, R.V., WACHSMUTH, I.K. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* from dairy cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.985-989, 1991.

WHITE, D.G.; ZAHO, S.; SIMJEE, S.; WAGNER, D.; McDERMOTT, P.F. Antimicrobial resistance of food borne pathogens. **Microbes and Infection**, v.4, p.405-12, 2002.

WIELER, L.H., VIELER, E., ERPENSTEIN, C., SCHLAPP, T., STEINRUCK, H., BAUERFEIND, R., BYOMI, A., BALJER, G. Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains from bovines association of adhesion with carriage of eae and other genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.2980-84, 1996.

WILSON, J.B., MCEWEN, S.A., CLARKE, R.C., LESLIE, K.E., WILSON, R.A., WALTNER-TOEWS, D., GYLES, C.L. Distribution and characteristics of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle. **Epidemiology and Infection**, v.108, p.423-30, 1992.

WISE, R.; SOULSBY, E.J.L. Antibiotic resistance an evolving problem. **Veterinary Record**, v.151, p.371-2, 2002.

WOLF, M.K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, n.4, p.569-84, 1997.

YOUNG, H.K. Do nonclinical uses of antibiotics make a difference? **Infection Control Hospital Epidemiology**, v.15, p.484-7, 1994.

ZHAO, S., WHITE, D.G., MCDERMOTT, P.F., FRIEDMAN, S., ENGLISH, L., AYERS, S., MENG, J., MAURER, J.J., HOLAND, R., WALKER, R.D. Identification and expression of cephamycinase bla CMY genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.3647-50, 2001.

ZSCHOCK, M.; HAMANN, H.P.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p.203-8, 2000.