



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

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

HENRIQUE ORSI

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

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

BOTUCATU – SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

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

HENRIQUE ORSI

VERA LÚCIA MORES RALL

RODRIGO TAVANELLI HERNANDES

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

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

BOTUCATU – SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Orsi, Henrique.

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

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

Orientador: Vera Lúcia Mores Rall

Coorientador: Rodrigo Tavanelli Hernandez

Capes: 21201021

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Victor Wooten

RESUMO

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

Palavras-chave: grupo filogenético, PFGE, biofilme, KPC.

ABSTRACT

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

Keywords: phylogenetic group, PFGE, biofilm, KPC.

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE TABELAS

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

SUMÁRIO

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

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

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Mastite bovina

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

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

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

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

1.2. *Escherichia coli*

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

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

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

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

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

1.2.1. *E.coli* diarreiogênica

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

1.2.1.1. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.1.3. *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

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

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

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

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

1.2.1.4. *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC):

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

1.2.1.5. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC):

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

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

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

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

327
328 1.2.2. *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC):

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.3. Grupos filogenéticos

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

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

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

apresentar perfil semelhante ao grupo A (*trpAGP*⁻, *trpBA*⁺) e E (*arpAgpE*⁺, *trpBA*⁺), que poderia apresentar perfil semelhante ao grupo D (*arpAgpE*⁻, *trpBA*⁺). A partir deste novo método, foi realizada nova comparação com a tipagem por MLST e confirmado o aumento da precisão deste teste.

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

1.3. Resistência aos antimicrobianos:

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

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

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

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

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

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

1.3.1. Resistência aos β -lactâmicos:

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

β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

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

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

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

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

β -lactamases tipo AmpC

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

plasmidiais. Até 2016, foram descritas 130 β -lactamases do tipo CMY (POWERS, 2016).

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

Carbapenemases

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

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

1.3.2. Resistência à colistina

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

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

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

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

1.4. Produção de biofilme

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

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

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

2. OBJETIVO

Caracterizar molecularmente isolados de *Escherichia coli* obtidos de leite de vacas com mastite clínica, investigar padrões de aderência, resistência aos antimicrobianos, produção de biofilme e o possível papel zoonótico desses isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. Propriedades e coletas das amostras de leite

Foram amostrados quatro rebanhos leiteiros no interior do Estado de São Paulo (propriedades próximas a São Pedro, Araras, São Carlos, São Manuel e Mococa) e mais seis, no interior de Minas Gerais (propriedades próximas a Machado, Três Corações, Poços de Caldas e região). Estes rebanhos possuíam em comum os seguintes critérios de inclusão:

1. Programas de controle de mastite (com registros de dados em softwares de gerenciamento);
2. Contagem de células somáticas (CCS) < 400.000 cs/mL (valor adotado para celularidade de vacas pela IN 62);
3. Raças holandesas de alta produção > 20 litros/vaca/dia, com no mínimo de 200 vacas em lactação, em regime de ordenha mecânica.

A diversidade de rebanhos e animais possibilita maior diversidade genotípica das *E. coli* e na comparação dos fatores de virulência dos isolados dentro e entre os rebanhos estudados.

A mastite clínica foi diagnosticada com base nas alterações macroscópicas do leite na prova da caneca telada de fundo escuro, na presença de sinais clínicos da inflamação da glândula mamária e/ou sinais sistêmicos nos animais (RADOSTITIS et al., 2007). A coleta foi realizada em frascos de vidros estéreis, após a antissepsia dos óstios dos tetos com álcool iodado a 3%, sendo encaminhados sob refrigeração (4 a 8°C) ao laboratório para processamento no mesmo dia. Essas coletas foram realizadas pela equipe do Professor Titular Hélio Langoni, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu, dentro do projeto Temático (FAPESP 2015/19688-8): *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus spp*: Impacto dos fatores de virulência na mastite bovina e reflexos na saúde pública, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP/Botucatu (N °0136/2017).

3.2. Isolamento e identificação de *E. coli*

Após incubação das amostras de leite em ágar sangue desfibrinado de carneiro (5%) e em ágar MacConkey, ambas as placas a 37°C/24h, as colônias características foram identificadas utilizando-se os teste de EPM, MILi e citrato (EPM: produção gás/glicose, produção de ácido sulfídrico, hidrólise da uréia e desaminação do L-triptofano; MILi: motilidade, produção de indol e descarboxilação da lisina e citrato de Simmons) (TRABULSI et al., 2005).

O cultivo e identificação dos micro-organismos de todas as amostras de leite foram realizados nos seguintes laboratórios: Núcleo de Pesquisas em Mastites (NUPEMAS), da FMVZ-UNESP, Botucatu-SP; Laboratório de diagnóstico microbiológico da FMVZ-UNESP, Botucatu-SP; Laboratório de Pesquisa em mastite FMVZ-UNESP, Botucatu-SP e Laboratório de Sanidade Animal de Bauru (LASAB) da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA/SAA, Bauru-SP, sob a responsabilidade dos pesquisadores envolvidos no projeto.

3.3. Caracterização molecular dos isolados de *Escherichia coli*

3.3.1. Extração do DNA

Uma colônia reisolada em ágar MacConkey foi inserida em um tubo de microcentrífuga contendo 200 µl de água ultrapura estéril e submetido à fervura por 10 minutos e, posteriormente, à centrífuga de 10000 rpm por um minuto. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo que foi utilizado para as reações em cadeia da polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction).

3.3.2. Identificação de genes associados à patogenicidade

Foram investigados os genes comumente associados à DEC e ExPEC (Tabela 1 e 2 respectivamente). Para cada reação foi utilizado 7,5 µl de GoTaq Green Master Mix (Promega, USA), 5,5 µl de H₂O livre de nucleases (incluso no GoTaq Green Master Mix) 0,34 µM de cada iniciador e 1 µl do DNA molde. Após a reação, 8 µl foi colocado nos poços de um gel de agarose preparado com TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X e corado por SYBR Safe (Invitrogen). Foi realizada eletroforese nas seguintes condições: tensão = 80V; corrente = 400mA e tempo de corrida = 40 minutos. O resultado foi capturado

para análise através de um transiluminador ultravioleta UVC1-1200 e SmartView Pro Imager System 1200 (Major Science).

As cepas *E. coli* 042 (*aaiA*+, *aaiC*+, *aaiG*+, *irp2*+, *astA*+, EDL933 (*iha*+, C1845 (*sat*+, RS218 (*sfaDE*+, *vat*+, *iroN*+, *ibe10*+, *ompT*+, *traT*+, J96 (*fimA*+, *fimH*+, *papA*+, *papC*+, *hlyA*+, *cnf1*+, *KpsMTII*+, A30 (*ecpA*+, *afaBC*+, V27 (*ireA*+, 1551-2 (*cdt*+, EC40 (*sitA*+) e *Shigella flexneri* SA101 (*iucD*+) foram utilizadas como controle positivo enquanto a *E. coli* laboratorial C600 (*afaBC*-, *traT*-, *cdt*-, *astA*-), J53 (*sfaDE*-, *iha*-, *papA*-, *papC*-, *hlyA*-, *cnf1*-, *sat*-, *vat*-, *irp2*-, *iucD*-, *ireA*-, *sitA*-, *ibe10*-, *KpsMTII*-), A30 (*iroN*-), 042 (*ompT*-), *Klebsiella pneumoniae* CF504 (*fimH*-) e *Shigella flexneri* SA101 (*ecpA*-) foram usadas como controle negativo na pesquisa das ExPEC. Para os genes de DEC foram utilizadas como controles positivos *E. coli* diarreiogênica EPEC-E2348/69 (*escN*+, *bfpA*+, EHEC-EDL933 (*stx1*+, *stx2*+, *ehxA*+, ETEC-H10407 (*est*+, EIEC-EDL1284 (*ipaH*+, EAEC-042 (*aatA*+, *aggR*+, STEC-C1845 (*daaE*+) e *E. coli* laboratorial C600 como controle negativo para todas as reações.

Tabela 1. Genes de virulência e sequências dos iniciadores empregados nas reações de PCR para a pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* diarreiogênicas (continua).

Genes	Sequência dos iniciadores (5' → 3')	Referência
<i>escN</i>	CGACGACTATTGCAGCGT GCCTTATCTGCTTCAGGA	HERNANDES et al. (2013)
<i>bfpA</i>	CAATGGTGTCTTGCGCTTGCT GCCGCTTTATCCAACCTGGT	GUNZBURG et al. (1995)
<i>stx1</i>	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	PATON e PATON (1998a)
<i>stx2</i>	GGCACTGTCTGAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	PATON e PATON (1998a)
<i>est</i>	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT CACCCGGTACARGCAGGATT	ARANDA et al. (2007)
<i>ipaH</i>	GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	TOMA et al. (2003)
<i>aggR</i>	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	TOMA et al. (2003)

Tabela 1. Genes de virulência e sequências dos iniciadores empregados nas reações de PCR para a pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* diarréiogênicas (continuação).

<i>aatA</i>	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	SCHMIDT <i>et al.</i> (1995a)
<i>ltA</i>	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	SCHULTSZ <i>et al.</i> (1994)
<i>daaE</i>	CACTGTGGGCTCCGCGCAAGC CGGTGAGGTTCACTGTGTAT	CAMPOS <i>et al.</i> (1999)
<i>ehxA</i>	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG TCTCGCCTGATAGTGTGTTGGTA	TOMA <i>et al.</i> , (2004)
<i>aaiA</i>	CCCACGAGTACAGATAACG GTTTCAGGATTGCCATTAG	ANDRADE <i>et al.</i> (2014)
<i>aaiC</i>	ATTGTCCTCAGGCATTTACACAG GACACCCCTGATAAACAAC	Adaptado de LIMA <i>et al.</i> (2013)
<i>aaiG</i>	GGGAGTGTTCAGTCTGGAC TTATCGGTGATAAGACTACCACTT	Adaptado de ANDRADE <i>et al.</i> (2014)
<i>astA</i>	CCATCAACACAGTATATCCGA GGTCGCGAGTGACGGCTTTG	SAVARINO <i>et al.</i> (1993)

Tabela 2. Genes de virulência e sequências dos iniciadores usados na pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* extraintestinal (ExPEC) (continua).

Genes	Sequência dos iniciadores (5' → 3')	Referência
Adesinas		
<i>sfaDE</i>	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	LE BOUGUENEC <i>et al.</i> (1992)
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	JOHNSON e STELL (2000)
<i>iha</i>	CAGGTCGGGGTTACCAAGT CAAATGGCTCTCTCCGTCAATGC	SZALO <i>et al.</i> (2002)
<i>ecpA</i>	GCAACAGCCAAAAAAGACACC CCAGGTCGCGTCGAACT	HERNANDES <i>et al.</i> (2011)
<i>papA</i>	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	JOHNSON E STELL (2000)

Tabela 2. Genes de virulência e sequência dos iniciadores usados na pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* extraintestinal (ExPEC) (continuação).

<i>papC</i>	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	LE BOUGUENEC et al. (1992)
<i>afaBC</i>	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	LE BOUGUENEC et al. (1992)
Toxinas		
<i>hlyA</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCAATCCCGTCA	JOHNSON e STELL (2000)
<i>sat</i>	TGCTGGCTCTGGAGGAAC TTGAACATTCAGAGTACCGGG	EWERS et al. (2007)
<i>vat</i>	AACGGTTGGTGGCAACAATCC AGCCCTGTAGAATGGCGAGTA	BOISEN et al. (2009)
<i>cnf1</i>	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	YAMAMOTO et al. (1995)
<i>cdt</i>	GAAARTAAATGGAAYAYAMATGTCCG AATCWCCWRSATCATCCAGTTA	TENNANT et al. (2009)
Sideróforos		
<i>iroN</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTGCCCCG GACGCCGACATTAAGACGCAG	JOHNSON et al. (2000a)
<i>irp2</i>	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	CZECZULIN et al. (1999)
<i>iucD</i>	AAGTGTGATTTTATTGGTGTA CCATCCGATGTCAGTTTTCTG	DEZFULIAN et al. (2003)
<i>ireA</i>	ATTGCCGTGATGTGTTCTGC CACGGATCACTTCAATGCGT	EWERS et al. (2007)
<i>sitA</i>	AGGGGGCACAAGTATTCTCG TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	RODRIGUEZ-SIEK et al. (2005)
Invasina		
<i>ibe10</i>	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC TGCTGCTCCGGCAAACCATGC	JOHNSON e STELL (2000)
Protactinas		
<i>traT</i>	GGTGTGGTGCATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	JOHNSON e STELL (2000)
<i>kpsMTII</i>	GCGCATTTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	JOHNSON e STELL (2000)
<i>ompT</i>	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC CCCGGGTCATAGTGTTCATC	JOHNSON et al. (2000b)

3.3.3. Identificação de grupo filogenético

As amostras foram testadas em PCR quadruplex com os primers para *arpA*, *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2, segundo o preconizado por Clermont e colaboradores (2013). Para a confirmação de grupos A ou C em caso de sobreposição, foram utilizados os primers para TrpAgpC, para confirmação do grupo C e TrpBA como controle interno da reação. Para sobreposição de grupos D e E, foi utilizado os primers para ArpAgpE e TrpBA. As condições do termociclador utilizadas foram: desnaturação à 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C/30 segundos, 59°C/30 segundos para o quadruplex e teste para confirmação do grupo C e 57°C/30 segundos para confirmação do grupo E e 72°C/30 segundos; extensão final de 72°C/7 minutos. Para o PCR quadruplex foram utilizados como controles positivos as cepas padrão 042 (*arpA*⁺ e *chuA*⁺) e E2348/69 (*chuA*⁺, *yjaA*⁺ e TspE4C2⁺); para a confirmação do grupo C *E. coli* EC51 (TrpAgpC⁺) e C600 como controle negativo e para o grupo E *E. coli* EDL933 (ArpAgpE⁺) e E2348/69 como controle negativo.

3.3.4. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

As amostras foram semeadas em ágar tripticase de soja (TSA, Oxoid) e incubadas *overnight*, à 35°C. No dia seguinte, foram diluídas até a escala 5 de MacFarland (15×10^8 células/ml) em tampão de suspensão celular (10ml de Tris 1M e 20ml de EDTA 0,5M pH 8,0 mais 100 ml de água ultrapura). A confirmação do número de células foi feita em espectrofotômetro com a leitura a 610 nm, esperando obter absorbância entre 0,8 e 1. A agarose para confecção dos plugues foi preparada utilizando agarose ultra-pura (Pulsed Field Certified Agarose - Bio-Rad) a 1,2% diluída em tampão Tris-EDTA (TE). Alíquotas de 200 µl das soluções contendo as amostras com a absorbância já ajustada foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. A seguir, acrescentou-se 10 µl de proteinase K (20mg/ml) e 5 µl de lisozima em cada tubo e o conteúdo foi homogeneizado no vórtex. Então 200 µl da agarose 1,2% foram adicionados a cada tubo e esta solução foi utilizada para preencher os poços da régua de confecção de plugues.

Após solidificação, os plugues foram inseridos em tubos falcon contendo 5 ml de tampão de lise (Tris 50mM, EDTA 50mM, pH 8,0 + 1% de sarcosil + 0,1mg/mL Proteinase K) e incubados à 54°C por duas horas com agitação constante (120 rpm). Terminado este tempo, os plugues foram levados com água ultrapura e retornados à incubação agora a 50°C por 15 minutos duas vezes e, em seguida, o mesmo

procedimento de incubação e foram realizadas quatro lavagens, utilizando TE ao invés da água ultrapura.

Uma fatia de, aproximadamente, 2 mm foi cortada de cada plugue e inserida em tubos de microcentrífuga contendo 42 µl de água livre de nuclease e 5 mg da enzima de restrição *XbaI* à 20 mg/ml em conjunto com 3 ml do buffer 10X, utilizando recomendações do fabricante (Thermo Fischer e SibEnzyme). Estes tubos foram incubados a 37°C por 18 horas.

Para a preparação do gel, as fatias cortadas foram colocadas em um pente até secarem e aderirem e então foi despejado agarose ultra-pura 1% em TBE 0,5X no molde. Após a solidificação, o gel foi levado à cuba do sistema Chef Mapper (Bio-Rad) e a corrida foi realizada nas seguintes condições: pulso inicial de 6,76 segundos; pulso final de 35,38 segundos; tensão de 6V/cm; ângulo de 120°; tempo de 18 horas (PulseNet, CDC, 2017).

Ao término da corrida, os géis foram corados em solução de 300 ml de TBE 0,5X com 30 µl de brometo de etídio 1% (Sigma) por uma hora em agitação seguido de lavagem com água destilada por 30 minutos. O resultado foi obtido em transiluminador ultravioleta UVCI-1200 e SmartView Pro Imager System 1200 (Major Science) e analisados utilizando o software Bionumerics (versão 7.6), para determinar a similaridade entre os isolados. Como padrão de peso molecular, foi utilizado fragmentos de DNA da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Braenderup H9812 (ATCC® BAA664TM).

3.4. Teste de adesão

3.4.1. Teste com Giemsa

Os dois isolados classificados como EPEC e os quatro possíveis EAEC foram submetidos ao teste de adesão *in vitro* de células HeLa para diagnóstico de seu padrão de adesão segundo o proposto por Cravioto e colaboradores (1979) com adaptações. As células HeLa foram mantidas em garrafas de cultivo contendo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma) e 1 % do antibiótico PenStrep (10.000 U penicilina + 10mg estreptomicina/ml) (Sigma). As garrafas foram mantidas em estufa de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

Para a montagem da placa para o teste, foi utilizada uma placa de 24 poços com lamínulas de vidro previamente autoclavadas. O meio da garrafa foi desprezado,

seguido de lavagem com 1 ml de tripsina para a remoção de células mortas e resíduos. Após o descarte dessa tripsina, foi adicionada nova alíquota (1 mL) dessa substância e a garrafa foi levada à estufa por 2 minutos. Após isso, as células foram soltas da garrafa por impacto mecânico. O volume da garrafa foi completado com 4 ml de DMEM + SFB e PenStrep e 10 µl deste conteúdo foi colocado em câmara de Neubauer para contagem do número de células. Foi calculada a média do número de células dos quatro quartos da câmara, a partir da qual foram realizados os cálculos para a utilização dessas células em concentração de 10^5 /mL. A seguir, 1 ml foi distribuído em cada poço e a placa foi incubada por 48 horas à 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂.

Após esse período, foi conferido se os tapetes atingiram estágio de semiconfluência de 70 a 90%. O meio foi retirado por bomba de vácuo e lavados duas vezes com tampão fosfato (PBS, Phosphate buffered saline). A seguir, 1 ml de meio contendo DMEN + 2% de D-manose e 2% SFB foram adicionados em cada poço.

Em cada poço devidamente sinalizado, foram aliquoteados 20 µl das amostras em teste e do controle JPN15, previamente crescidos em caldo Luria-Bertani (LB) (37°C/24h). A placa foi incubada a 37°C, em estufa de 5% de CO₂ e após três horas, foi realizada uma lavagem com PBS, acrescentando-se mais 1 mL do mesmo meio. Além disso, neste momento foram semeados os controles 042, C1845, E2348/69 e HB101. A placa foi levada à estufa novamente, sob as mesmas condições de incubação. A seguir, os poços foram lavados seis vezes com PBS e fixados com metanol por 18 horas.

Pouco antes do término desse período, foram preparados os corantes May-Grünwald (MG) (coloração de células eucarióticas) e Giemsa (coloração de células bacterianas). Para o MG, foi preparada uma solução na proporção 2:1:1 (corante, água Mili-Q: tampão de Sorensen). Para o Giemsa, a proporção foi 1:1:1, utilizando-se os mesmos reagentes. O volume total de cada solução foi calculado a partir do número de poços da placa. Cada preparação foi filtrada com papel de filtro e colocadas em tubos falcon.

Após as 18 horas de incubação para fixação, o metanol foi retirado e 500 µl do filtrado de MG foram inseridos em cada poço por 5 minutos. O corante foi descartado e 500 µl de Giemsa foram adicionados em cada poço por 20 minutos. Em seguida, esse volume foi descartado e a placa lavada com água corrente até a remoção do excesso de corante.

As lamínulas foram removidas da placa com o auxílio de uma pinça e uma agulha e deixadas para secar por 30 a 60 minutos. Após, as lamínulas foram coladas nas

lâminas com o auxílio de esmalte incolor e visualizadas em microscópio óptico de luz com aumento de 1000 vezes, com o auxílio de óleo de imersão.

3.4.2 Teste de coloração fluorescente da actina (*Fluorescent actin staining* – FAS)

A placa de 24 poços utilizada foi preparada conforme descrito no item 3.4.1. Em cada poço foram aliqüotados 20 µl das amostras em teste, previamente crescidas em caldo Luria-Bertani (LB, à 37°C/24h. A placa foi incubada a 37°C, em estufa de 5% de CO₂ e após três horas, foi realizada uma lavagem com PBS, acrescentando-se mais 1 mL do mesmo meio e 20 µl dos controles E2348/69 e 042 em seus devidos poços. A placa foi incubada novamente por três horas, os poços foram lavados seis vezes com PBS e fixados com formaldeído por 18 horas.

A seguir, o formaldeído foi removido, a placa foi lavada três vezes com PBS e foi acrescido 1 ml de Triton X100 a 1% em cada poço. Após cinco minutos, a placa foi lavada novamente com PBS duas vezes e foram adicionados 200 µl de solução contendo PBS, faloidina (1:125) e DAPI (1:500). A placa foi armazenada em local com ausência de luz por 20 minutos. Finalmente, foram adicionados 300 µl de PBS e a placa foi lavada logo em seguida três vezes com PBS e foram retiradas as lamínulas, que foram coladas em lâminas utilizando glicerol (9:1) e o resultado foi observado em microscópio de fluorescência.

3.5. Resistência aos β-lactâmicos

Para o teste de triagem, cada isolado de *E. coli* foi semeado em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid) e incubado à 35°C por 6 horas. A seguir, foi realizada diluição em salina (NaCl a 0,9%) até a escala 0,5 de MacFarland (1,5 x 10⁸). Essa diluição foi semeada na superfície do ágar Mueller-Hinton (MH, Oxoid), com o auxílio de um swab estéril.

Após secagem da superfície, foram adicionados os discos de antimicrobianos de ceftazidima (30 µg), aztreonam (30 µg), cefotaxima (30 µg) e ceftriaxona (30 µg) e cada placa foi incubada a 35±2°C durante 16 a 18 horas para posterior análise dos diâmetros dos halos de inibição para determinação da sensibilidade do isolado.

Na ocorrência de halo menor que o preconizado (Tabela 3) pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015), a multirresistência foi confirmada

utilizando-se o Teste de Disco Aproximação, com o uso do disco amoxa-clavulanato, como inibidor da ESBL e dos substratos aztreonam, cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona (eleitos devido à maioria das ESBL ter atividade sobre monobactâmicos e cefalosporinas de terceira e quarta gerações).

Tabela 3. Tipos de antimicrobianos, suas concentrações e diâmetro dos halos utilizados como referência para verificação de resistência de *E. coli* produtoras de ESBL segundo CLSI 2015.

Antibióticos	Concentrações utilizadas	Diâmetro dos halos		
		Sensível	Intermediário	Resistente
Ceftazidima	30 µg	≥ 21 mm	18 a 20 mm	≤ 17 mm
Ceftriaxona		≥ 23 mm	20 a 22 mm	≤ 19 mm
Cefotaxima		≥ 26 mm	23 a 25 mm	≤ 22 mm
Aztreonam		≥ 21 mm	18 a 20 mm	≤ 17 mm

Havendo a presença da distorção de algum halo formando “zona fantasma”, a amostra deve ser considerada ESBL-positiva. Caso contrário, deve ser considerada negativa.

3.6 Pesquisa de genes de resistência

Para confirmação da resistência aos beta-lactâmicos, os isolados foram submetidas a PCR, para a pesquisa de alguns genes envolvidos, relacionados na Tabela 4. Isolados que apresentaram o gene bla_{CTX-M} foram submetidos ao sequenciamento por Sanger, para classificação do grupo CTX-M a qual pertencem.

845 **Tabela 4.** Sequência de iniciadores utilizados na pesquisa de ESBL.

Primers	Sequência dos iniciadores	Referência
<i>bla_{TEM}</i>	ATGAGTATTCAACATTTCCGTG TTACCAATGCTTAATCAGTGAG	KRUGER et al. (2004)
<i>bla_{SHV}</i>	ATTTGTGCTTCTTTACTCGC TTTATGGCGTTACCTTTGACC	YAGI et al. (2000)
<i>bla_{CTX-M}</i>	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	EDELSTEIN et al. (2003)
<i>bla_{CTX-M2}</i>	AAATGTGCTGCTCCTTTTCGTGAGC AGGGTTCGTTGCAAGACAAGACTG	GARCIA et al. (2008)
<i>bla_{CTX-M8}</i>	GCAAGCGCATTTTTGTTTTT GACGACTTTCTGCCTTCTGC	FERNANDES et al. (2017)
<i>bla_{CTX-M15}</i>	CACACGTGGAATTTAGGGACT GCCGTCTAAGGCGATAAACA	PITOUT et al. (2004)
<i>bla_{KPC}</i>	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	POIREL et al. (2011)
<i>bla_{NDM}</i>	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	POIREL et al. (2011)
<i>mcr-1</i>	GGTCAGTCCGTTTGTTT CTTGGTCGGTCTGTA	LIU et al. (2016)
<i>mcr-2</i>	ATGACATCACATCACTCTTGG TTACTGGATAAATGCCGCGC	LIASSINE et al. (2016)

846

847

848 **3.7. Produção de biofilme**

849

850 A produção de biofilme por isolados de *E. coli* foi quantificada pelo método
851 descrito por Stepanovic et al. (2007), com modificações. Os isolados foram repicados
852 em tubos contendo caldo BHI e mantidos à 37°C por 24 horas. A seguir, a turbidez foi
853 ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em tubos com
854 BHI + 0,5% de glicose. A seguir, 200 µL desta suspensão foram transferidos em
855 quadruplicata para placas de poliestireno de fundo reto contendo 96 poços, incubadas a
856 37°/24h.

Em cada placa, foi também adicionado em quadruplicata 200 µL de BHI + 0,5% de glicose estéril para controle (branco) e a cepa *E. coli* 042 foi utilizada como controle positivo. Após a incubação, foram realizadas três lavagens com PBS para remoção de células não aderidas e as placas ficaram em temperatura ambiente até secar, para que os poços fossem corados com 200µl de cristal violeta 1% por 10 minutos. Após este tempo, o corante foi removido e os poços foram lavados com água destilada até remover o excesso de corante. As placas foram secas novamente em temperatura ambiente e os biofilmes corados foram suspensos com ácido acético glacial 33% e visualizados em leitor Elisa à 470nm.

Para o cálculo do ponto de corte (ODc) entre produtoras e não produtoras de biofilme, foi feita a média das densidades ópticas (OD) do branco e somada ao triplo do desvio padrão do branco. A média das densidades ópticas dos isolados foi classificada de acordo com o preconizado por Yang e colaboradores (2018), classificando cada isolado como não produtor (média da OD de um isolado (ODi) $\leq$ ODc); fraco produtor ($ODc < ODi \leq 2 \times ODc$); moderado produtor ($ODc < 2 \times ODi \leq 4 \times ODc$); forte produtor ($ODc < 4 \times ODi \leq 8 \times ODc$); muito forte produtor ($ODc < 8 \times ODi \leq 16 \times ODc$) e como extremamente forte produtor ($ODi > 16 \times ODc$).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização molecular dos isolados de *Escherichia coli*

Considerando-se os 161 isolados de *E.coli* recuperados a partir de leite de vacas com mastite clínica, somente dois (1,2%) foram considerados DEC por apresentarem gene característico (*escN*⁺), sendo que quatro (2,5%) apresentaram os genes *aaiA* e *aaiC*, normalmente associados a EAEC. Dentre os isolados portadores de genes de DEC, dois (*aaiA*⁺ e *aaiC*⁺) foram classificados no grupo A, um no grupo B1 e um no grupo desconhecido e os dois portadores do gene *escN*, no filogruppo B1. Os isolados que apresentaram *escN*, devido à ausência do gene codificador de *bundle-forming pili* (*bfpA*) foram classificados como EPEC atípicas e, os demais isolados como ExPEC. Em relação ao grupo filogenético, 85 (52,8%) isolados foram classificados no grupo B1, 59 (36,6%) no grupo A, oito (4,97%) no grupo E, quatro (2,48%) no C, dois (1,24%) no B2 e um (0,62%) no D. Dois (1,24%) isolados foram incluídos no grupo desconhecido. Pela Figura 1, pode-se observar um gel de agarose para detecção de *arpA*, *chuA*, *yjaA* e TspE4.C2.

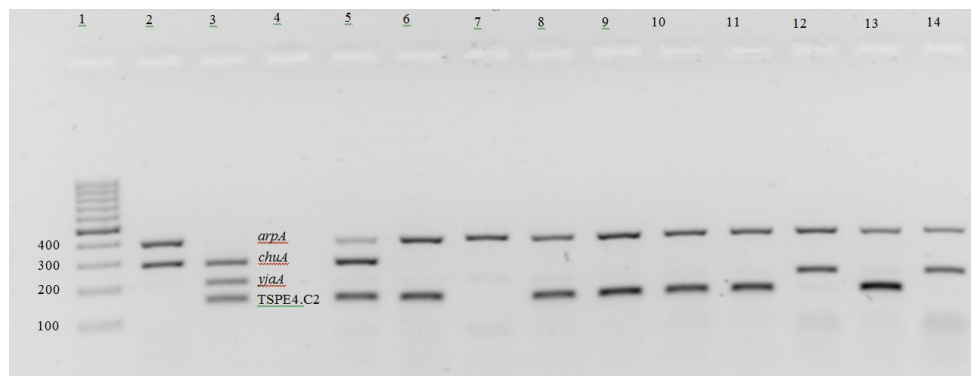


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose para detecção dos genes *arpA* (400 pb), *chuA* (288 pb), *yjaA* (211 pb) e TspE4C2 (152 pb) para classificação de *E. coli* isoladas de leite de vacas com mastite clínica nos grupos filogenéticos. Poço 1: 100 pb DNA ladder; poço 2: controle positivo *E. coli* 042; poço 3: controle positivo *E. coli* E2348/69; poço 4: branco; poços 5-14: amostras.

A Tabela 5 apresenta os genes que codificam fatores de virulência entre os 159 isolados de ExPEC, obtidos a partir de leite de vacas com mastite bovina, considerando-

se os grupos filogenéticos, podendo-se observar que o gene *fimH* foi o mais frequente, ocorrendo em 99,3% dos isolados.

Dentro do filogruppo B1, os isolados apresentavam de um (*fimH*) à oito (*fimH*, *ecpA*, *hlyA*, *iroN*, *irp2*, *sitA*, *ompT* e *traT*) genes pesquisados; dentro de A, dois (*fimH/ecpA*, *fimH/traT*, *fimH/kpsMTII*) à cinco (*fimH*, *ecpA*, *hlyA*, *sitA* e *traT*) e um isolado não apresentou *fimH*; dentro de E, dois (*fimH/traT*) à oito (*fimH*, *ecpA*, *iroN*, *iucD*, *sitA*, *ompT*, *traT* e *kpsMTII*); dentro de C, um (*fimH*) à três (*fimH*, *ecpA* e *traT*); dentro de B2, seis (*fimH*, *vat*, *irp2*, *sitA*, *ibe10*, e *ompT*) e oito (*fimH*, *hlyA*, *vat*, *sitA*, *ibe10*, *ompT*, *traT* e *kpsMTII*); dentro de D, seis (*fimH*, *ecpA*, *sitA*, *ompT*, *traT* e *kpsMTII*) e dentre os isolados não tipáveis pelo método (CLERMONT et al. 2013), cinco (*fimH*, *ecpA*, *hlyA*, *ompT* e *traT*) e seis (*aaiA*, *aaiC*, *fimH*, *irp2*, *ompT* e *traT*).

Os isolados dos grupos A, B1, C, D, E e não tipáveis não apresentaram a única invasina pesquisada (*ibe10*) enquanto os dois isolados de B2 apresentaram. Todos os isolados de B2 apresentaram os genes *vat*, *sitA*, *ibe10* e *ompT*. O gene *iucD* esteve presente exclusivamente em um isolado do grupo E.

917 **Tabela 5.** Distribuição dos genes que codificam fatores de virulência em 161 isolados de *E.coli* obtidos a partir de
 918 leite de vacas com mastite clínica, considerando-se os grupos filogenéticos.

Gene	Grupo filogenético							919
	A	B1	B2	C	D	E	Desconhecido	Total N (%)
	(n = 59)	(n= 85)	(n = 2)	(n = 4)	(n = 1)	(n = 8)	(n = 2)	(n = 161)
<i>fimH</i>	58	85	2	4	1	8	2	160 (99,4%)
<i>ecpA</i>	38	59	0	3	1	6	1	108 (67,1%)
<i>hlyA</i>	1	9	1	0	0	0	1	12 (7,5%),
<i>vat</i>	1	0	2	0	0	0	0	3 (1,9%),
<i>cdt</i>	1	0	1	0	0	2	0	3 (1,9%),
<i>iroN</i>	0	4	0	0	0	1	0	5 (3,1%)
<i>irp2</i>	1	11	1	0	0	0	1	14 (8,7%),
<i>iucD</i>	0	0	0	0	0	1	0	1 (0,6%).
<i>sitA</i>	3	7	2	0	1	1	0	14 (8,7%)
<i>ibe10</i>	0	0	2	0	0	0	0	2 (1,2%)
<i>ompT</i>	7	42	2	0	1	6	2	60 (37,3%),
<i>traT</i>	48	65	1	2	1	7	2	126 (78,3%)
<i>kpsMT II</i>	4	0	1	0	1	1	0	7 (4,4%),
<i>astA</i>	0	7	0	0	0	2	0	9 (5,6%),

4.2.1 Teste de adesão

Dentre as amostras que apresentaram *aaiA*⁺/*aaiC*⁺, não foi observado padrão de aderência em células HeLa (Figura 2A). Considerando-se as duas amostras que apresentaram *escN*, o padrão observado foi o “Localizado-like”. (Figura 4B). Nas Figuras 2B, 3A, 3B e 4A é possível observar os controles utilizados em cada teste.

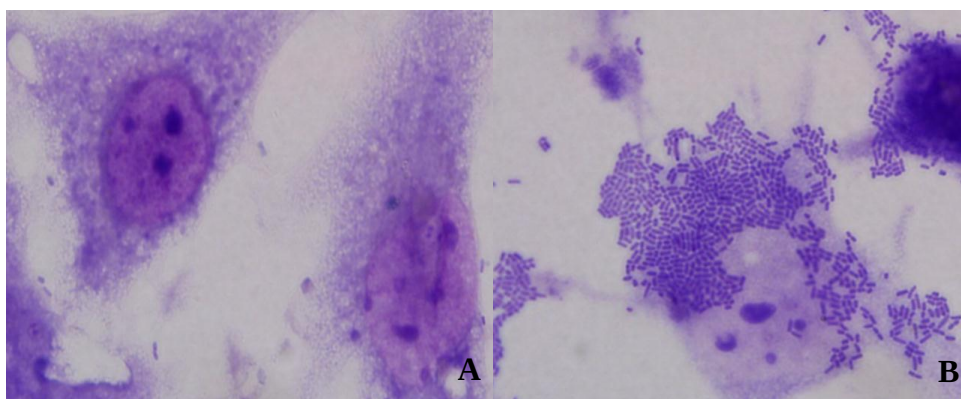


Figura 2. ExPEC *aaiA*⁺/*aaiC*⁺, sem padrão de adesão definido em células HeLa (A) e *E. coli* 042, utilizada como referência de padrão agregativo (B).

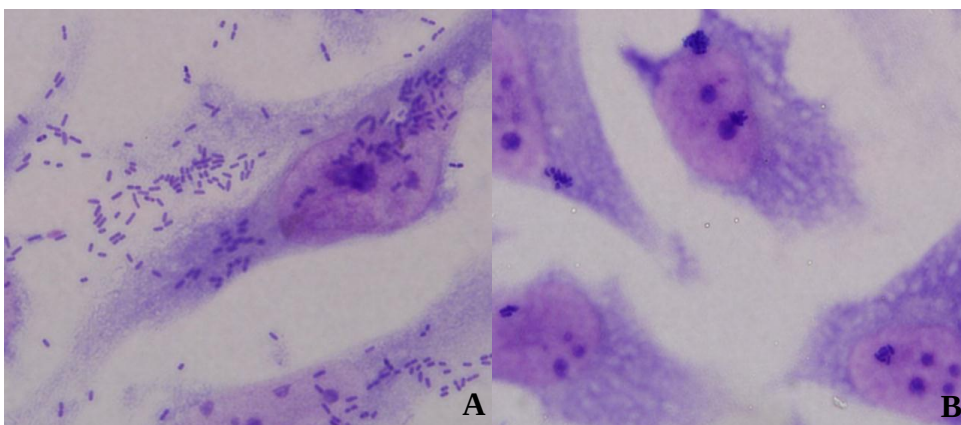


Figura 3. *E. coli* C1845 utilizada como referência para o padrão difusamente aderente em células HeLa (A) e *E. coli* E2348/69 utilizada como referência para o padrão localizado (B).

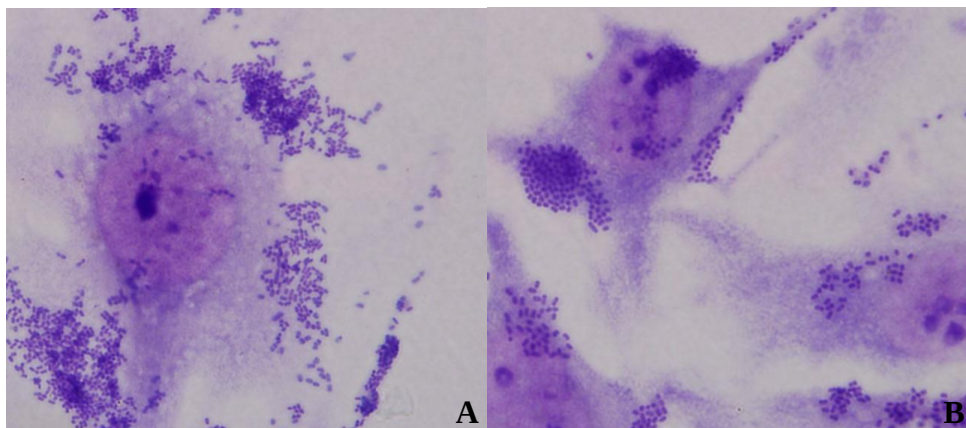


Figura 4. *E. coli* JPN15 utilizada como referência para padrão “Localizada-like” em células HeLa (A) e amostra portadora do gene *escN* apresentando o padrão “Localizado-like” (B).

4.2.2 Teste de FAS

Os dois isolados que apresentavam o gene *escN* e que tiveram seu padrão de adesão confirmado no teste de adesão corado por Giemsa foram submetidos ao teste de FAS (Figuras 5 e 6) para a confirmação de seu comportamento de acúmulo de actina no sítio de adesão, característico de EPEC tanto típicas como atípicas.

Ambos os isolados apresentaram resultado positivo para o acúmulo de actina, caracterizando-os como EPEC atípica devido à ausência do gene *bfpA*.

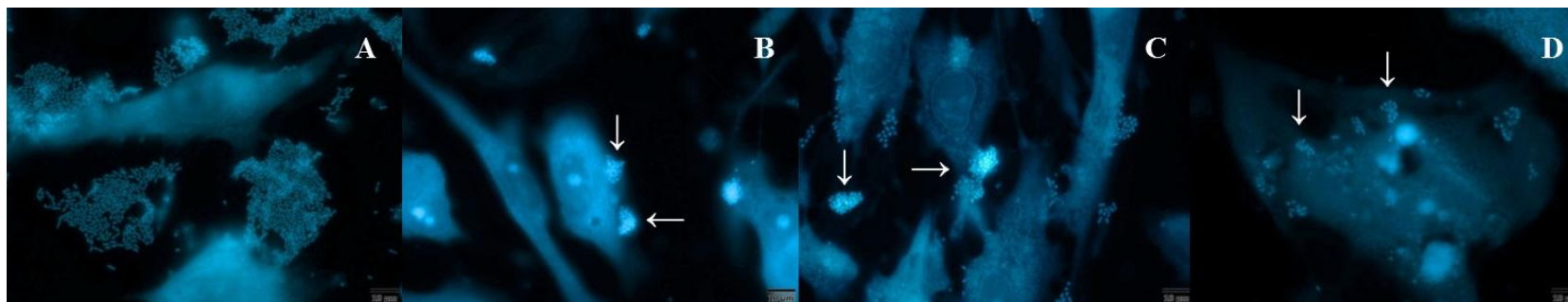


Figura 5. Teste de FAS corado com DAPI (evidencia DNA rico em adenina-timina é corado pela molécula de DAPI evidenciando o sítio de adesão das células bacterianas). Figuras (A) *E. coli* 042, controle negativo, que apresenta padrão de adesão agregativo, sem acúmulo de actina no sítio de adesão; (B) *E. coli* E2348/69, controle positivo, que exibe padrão de adesão localizado e, por ser uma *E. coli* enteropatogênica, acumula actina no sítio de adesão; (C) e (D) correspondem a dois isolados de *E. coli* *escN*⁺.

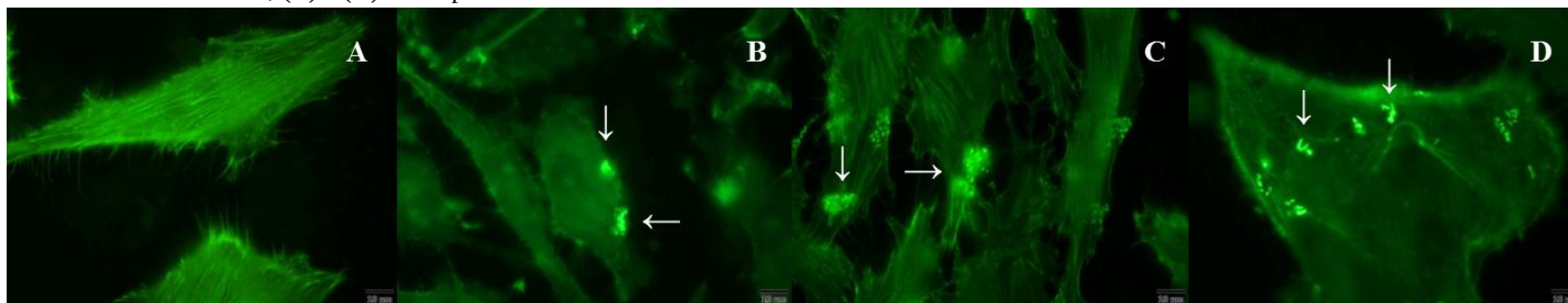


Figura 6. Teste de FAS corado com faloidina (evidencia actina acumulada no sítio de adesão). Figuras (A) *E. coli* 042, controle negativo; (B) *E. coli* E2348/69, controle positivo; (C) e (D) correspondem a dois isolados de *E. coli* *escN*⁺.

4.3.1 Resistência aos β -lactâmicos

Apenas um isolado apresentou resistência aos quatro antimicrobianos testados. Um outro apresentou resistência intermediária a cefotaxima, outro à ceftazidima e um terceiro, ao aztreonam. Na Figura 7, é possível observar um isolado resistente (A) e um sensível (B) aos antimicrobianos testados. Em (C) e (D) pode-se observar o teste confirmatório de produção de ESBL, com a formação da zona fantasma, pelos isolados resistentes.

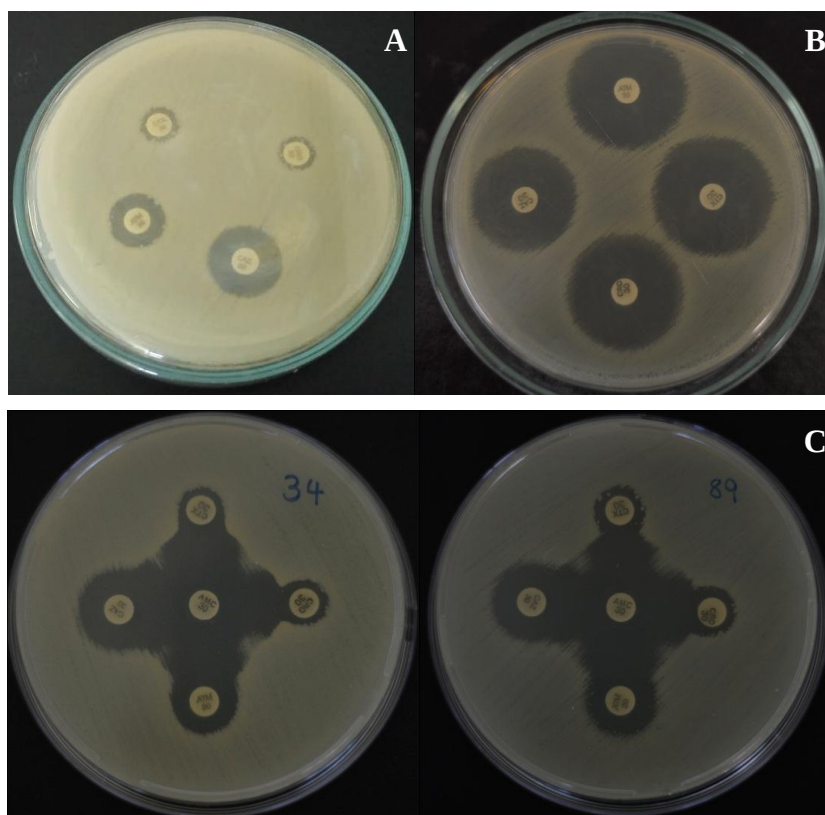


Figura 7. Antibiógrama de *Escherichia coli* com cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, aztreonam e amoxicilina + ácido clavulânico para verificação de produção de ESBL. Em (A), há a ilustração de um isolado resistente e em (B), um isolado sensível. Em (C) está o resultado do teste confirmatório de produção de ESBL considerados positivos devido à presença de distorção dos halos – “zona fantasma”.

4.3.2 Pesquisa de genes de resistência

O gene mais encontrado foi bla_{TEM}, em sete isolados, seguido de bla_{CTX-M-15} em dois e bla_{SHV} em um. Dois isolados apresentaram positividade para o primer inespecífico de bla_{CTX-M} que, após sequenciados, revelaram ser bla_{CTX-M-15}.

4.4. Produção de biofilme

Dentre as 161 amostras, 68 (42,2%) foram classificadas como não produtoras, 80 (49,7%) como fracas, 11 (6,8%) como moderadas e apenas duas (1,2%) foram fortes produtoras. A distribuição da capacidade de produção encontrada dentro dos grupos filogenéticos está apresentada na Figura 8.

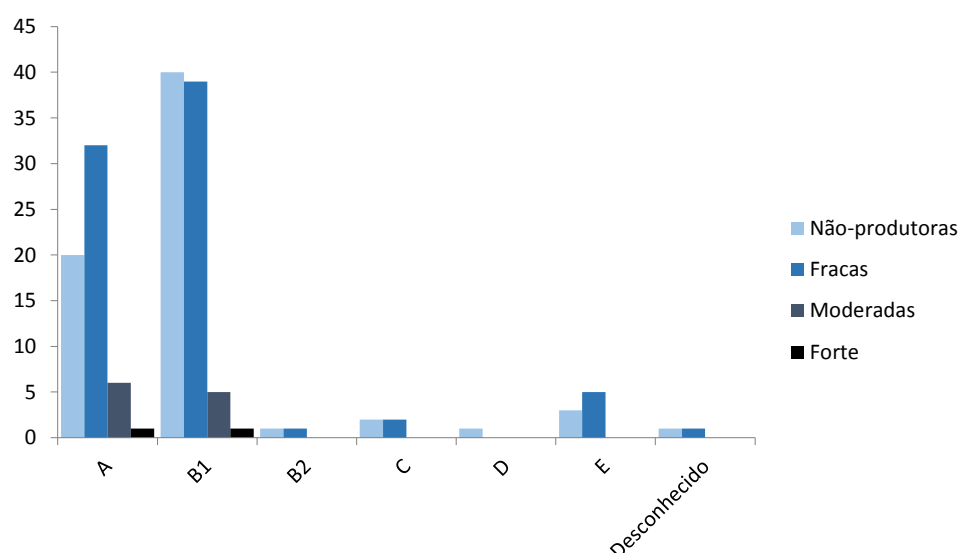


Figura 8. Produção de biofilme por isolados de *E. coli*, causadores de mastite clínica bovina, considerando-se os grupos filogenéticos.

4.5 Pulsed-field Gel Electrophoresis

Os pulsotipos encontrados e os agrupamentos por similaridade podem ser observados no Anexo 1. Para realizar os agrupamentos, o coeficiente mínimo de similaridade utilizado foi de 90%. Ao todo foram encontrados 10 clusters, sendo nove deles formados por animais distintos e apenas um formado por um caso de infecção crônica. Não foi encontrado nenhum cluster entre fazendas distintas.

5. DISCUSSÃO

Levando-se em consideração o perfil genético encontrado e o padrão de adesão em células HeLa observado, dois isolados foram classificados como EPEC atípica enquanto os demais 159 isolados foram classificados como ExPEC.

Apesar desses isolados não serem caracteristicamente diarreiogênicos, em algum momento podem entrar em contato com cepas que possuam genes para a patogenicidade humana e incorporá-los ao seu próprio genoma. Da mesma maneira, essa variabilidade genética pode atuar de maneira inversa, cedendo o gasto energético necessário para a manutenção dos genes de DEC em favorecimento de outros genes. O número de isolados com os genes de DEC foi baixo, porém pode ser interpretado como alerta ao crescimento da diversidade genética nos rebanhos estudados, indicando que há possibilidade de estas cepas ambientais se tornarem cada vez mais patogênicas aos humanos com o passar do tempo. Com isso, o monitoramento em rebanhos auxilia não apenas no controle da mastite clínica, como também pode prever futuras zoonoses, transformando a questão que anteriormente era exclusivamente de medicina veterinária em saúde pública.

Em relação aos grupos filogenéticos, realizar comparações diretas com estudos prévios foi uma limitação, visto que vários trabalhos recentes (OMBARAK et al., 2016; OLSON et al., 2018; FAZEL et al., 2019) ainda utilizaram a metodologia mais antiga de CLERMONT e colaboradores (2000) que, devido às limitações, permite somente a identificação dos grupos A, B1, B2 e D. Além disso, possuem baixa precisão para alguns grupos (CLERMONT et al., 2013), pois tais trabalhos são incapazes de evidenciar a presença de isolados do tipo C e E, subestimando sua presença populacional.

Em 2019, CLERMONT et al. (2019) caracterizaram o filogrupos G. A verificação da presença deste filogrupos não foi necessária nos isolados deste estudo, visto que não houve presença de estirpes do grupo F e as do filogrupos B2 apresentaram o gene *yjaA*. Este teste é realizado exclusivamente quando há isolados do filogrupos F e/ou quando há estirpes do filogrupos B2 que apresentam apenas *chuA* e TspE4.C2. As estirpes B2 deste estudo apresentaram além de *chuA* e TspE4.C2, o gene *yjaA*. Amostras que não foram típicas apresentaram positividade para o gene *arpA*, não havendo necessidade de pesquisar relação ao grupo G nestas amostras.

Apesar da origem comensal dos isolados de *E.coli* responsáveis por casos de mastite clínica estar rotineiramente ligada aos filogrupos A e B1 (BLUM e LEITNER, 2013; SAIDANI et al., 2018) e isolados invasivos e causadores de infecções extra-intestinais ao grupo B2 (CLERMONT et al., 2000; DAGA et al., 2019), não há uma relação direta na literatura. Acreditamos que os isolados deste estudo sejam de origem comensal devido ao ambiente onde os animais eram mantidos e por conta da falta de genes de virulência de grande parte dos isolados. Logo, esta infecção poderia ser mais bem controlada somente com práticas de manejo adequadas (retirada diária de dejetos, evitar umidade e matéria orgânica ambiental da pré e pós-ordenha, pré-dipping, oferecer alimento na pós-ordenha), reduzindo o risco de contaminação (HOGAN e SMITH, 2012).

Apesar dos isolados deste grupo serem classificados como ExPEC por não apresentarem marcadores característicos do grupo DEC, segundo a classificação de Johnson et al. (2003), apenas um isolado seria classificado como ExPEC (*iucD*⁺ e *kpsMTII*⁺). Isso evidencia que tal método não é adequado, ao menos em casos de infecções causadoras de mastite clínica. Resultados semelhantes foram obtidos por Guerra et al. (2019) que avaliaram 50 isolados de *E. coli* de mastite clínica bovina e somente um isolado seria considerado ExPEC, pela presença dos genes *iucD* e *KpsMTII*.

O gene *fimH*, não encontrado em apenas um dos isolados deste estudo, codifica a fímbria do tipo 1, que medeia a adesão da bactéria a manosídeos, permitindo a colonização de diversas superfícies epiteliais. Este gene pode apresentar variações, que podem ser responsáveis por transformar uma cepa comensal em patogênica por permitir colonizar superfícies distintas (SOKURENKO et al., 1998). No Brasil, Fernandes et al. (2011) observaram esse gene 100 % de seus isolados de mastite clínica bovina.

O gene *traT* foi o segundo mais encontrado (78,3%) e promove a síntese de uma proteína expressa na membrana externa, que medeia resistência ao soro e confere resistência à fagocitose (MELLATA et al., 2003). Entretanto, esse gene já foi encontrado em estirpes de *E. coli*, isoladas de vacas e ovelhas saudáveis (ACIK et al., 2004)

A adesina fimbrial *ecpA* pode ser encontrada tanto em isolados comensais como em patogênicos. Foi inicialmente descoberta em NMECs e atualmente é conhecida como *E. coli common pilus* (ECP) (HERNANDES et al., 2011), podendo influenciar na produção de biofilme (LEHTI et al., 2010). Apesar disso, uma entre as

duas fortes produtoras de biofilme encontrada neste trabalho não apresentou o gene *ecpA* sugerindo que, apesar de ser um marcador de virulência relacionado à ExPECs, há outros genes que devem ser pesquisados para melhor estudar a produção de biofilmes.

O gene *ompT* foi encontrado em 37% das amostras e é uma proteína externa de membrana, capaz de ativar plasminogênio humano, realizar hidrólise de peptídios antimicrobianos e, em *Escherichia coli* patogênica de aves (APEC), está envolvida em invasão, adesão e patogenicidade (HEJAIR et al., 2017). Seu papel no desenvolvimento de mastite ainda não é claro.

O gene *astA*, encontrado em nove (5,59%) isolados, não define o grupo de EAEC, apesar de estar intimamente relacionado. A proteína resultante de sua expressão é a enterotoxina termo-estável 1 de EAEC, comumente encontrada em isolados causadores de mastite clínica (BLUM e LEITNER, 2013).

A baixa prevalência dos genes pesquisados que codificam a produção de sideróforos (*irp2*, *sitA* e *iroN*) sugere que a maior parte dos isolados poderiam ter infectado as vacas durante a lactação e não durante a seca, visto que na lactação, além da imunossupressão, as vacas apresentam baixas concentrações de lactoferrina, responsável por sequestrar o ferro necessário para a sobrevivência da bactéria (GYLES e FAIRBROTHER, 2010). A baixa prevalência de *hlyA*, que codifica α -hemolisina, responsável por causar hemólise para poder obter ferro de hemácias, reforça esta hipótese.

Outro importante fator de virulência pesquisado foi *kpsMTII*, gene que codifica a cápsula do grupo II. As cápsulas, apesar de serem úteis para evasão do sistema imune, devido à sua espessura podem encobrir adesinas mais curtas, afetando a aderência da bactéria no hospedeiro e até mesmo suprimindo a expressão de biofilme (SCHEMBRI et al., 2004). Apesar de não estar relacionado diretamente à mastite, sabe-se que a presença de *kpsMTII* pode ser um indicativo de metrite pós-parto (KASSÉ et al., 2016).

O gene *ibe10*, que foi encontrado exclusivamente no grupo B2 neste estudo, é uma invasina inicialmente descrita em estirpe de *E.coli* que invadiu células endoteliais microvasculares cerebrais (HUANG et al., 1995), já tendo sido observado em isolados de *E.coli*, que causaram infecções em galinhas (KILANI et al., 2017), humanos (KACZMAREK et al., 2018) e em vacas com metrite (BICALHO et al., 2010). Apesar de não haver trabalhos demonstrando relação direta da presença de *ibe10* com mastite, sabe-se que este gene pode, em conjunto com outros fatores de virulência, promover metrite pós-parto e endometrite (BICALHO et al., 2010).

Os dois isolados diarreiogênicos não apresentaram nenhum dos genes de resistência pesquisados. Entre as ExPECs, o mais encontrado foi o gene *bla_{TEM}* em 7 (4,4%) isolados, dos quais cinco eram do filogrupa B1, um do A e um do E. Este gene codifica β -lactamase de espectro estendido que confere resistência às penicilinas e aminopenicilinas (POIREL et al., 2018). Apesar de ser o gene mais encontrado também em outros estudos, sua prevalência foi consideravelmente mais baixa em relação aos mesmos estudos. Em isolados causadores de mastite clínica obtidos na China, Yang e colaboradores (2018) encontraram *bla_{TEM}* em 58,7% das *E. coli* e Yu e colaboradores (2019), em 83,1%.

Os isolados que apresentaram *bla_{CTX-M-15}* foram relacionados com sua resistência (de fato ou intermediária) à ceftazidima e foram os únicos que apresentaram resultado positivo no teste de produção de ESBL. *E. coli* portadora do gene *bla_{CTX-M-15}* é mundialmente difundida (PITOUT e LAUPLAND, 2008) e já foi isolada de vacas com mastite clínica no Japão (OHNISHI et al., 2013), Reino Unido (TIMOFTE et al., 2014) e Turquia (PEHLIVANOGLU et al., 2016). A *E. coli* O25b-ST131 é multirresistente, sendo portadora do gene *bla_{CTX-M-15}*, pertencente ao filogrupa B2 (ROGERS et al., 2011). Coque et al., (2008) observaram esse gene em cepas de *E. coli*, classificadas como ST405 e pertencentes ao filogrupa D. Os isolados do presente estudo são do filogrupa A.

O gene *bla_{SHV}* já foi encontrado em *E. coli* produtora de ESBL isolada de vacas com mastite clínica em estudos na China (ALI et al., 2016). Assim como em estudo de Onanuga e colaboradores (2019), neste estudo foi encontrada relação entre presença de *bla_{CTX-M-15}* e produção de ESBL. Porém, no mesmo trabalho citado, foi encontrada relação entre presença de *bla_{SHV}* e produção de ESBL, o que não ocorreu no presente estudo, visto que o único isolado que apresentou o gene *bla_{SHV}* não mostrou sequer resistência intermediária aos antimicrobianos testados. Tal diferença pode ter ocorrido devido ao estudo de Onanuga e colaboradores ter sido realizado com UPECs.

A ausência do gene *bla_{KPC}* nos isolados estudados está de acordo com a literatura, uma vez que apesar de ser a carbapenemase mais comumente encontrada em *E. coli* isolada de humanos em diversos países (POIREL et al., 2018), ainda não foi encontrada em *E. coli* isoladas de animais com exceção de um isolado obtido a partir de um cachorro no Brasil, carregando a variante *bla_{KPC-2}* (SELLERA et al., 2018).

O gene *bla_{NDM}* já foi isolado de *E. coli* causadora de mastite clínica bovina (GHATAK et al., 2013). O resultado do presente estudo está de acordo com a literatura

consultada visto que não foram encontrados outros relatos de *E. coli* causadora de mastite clínica bovina, portando esse gene.

Em um estudo na China (LIU et al., 2019), *mcr-1* foi encontrado em isolados de *E. coli* causadora de mastite clínica em conjunto com o gene *bla*_{CTX-M-15}. Em um estudo na Grécia, Filioussis e colaboradores (2020) encontraram um isolado multirresistente produtor de ESBL e *mcr-1* positivo causador de infecção intramamária em vaca. Estes foram os únicos casos encontrados na literatura acessada. Brennan (2016) relatou a identificação de *E. coli* produtora de *mcr-1* obtidas a partir de gado, porém sem especificar se eram isolados causadores de mastite. Além disso, não foram encontrados relatos de *E. coli* causadora de mastite bovina portadora do gene *mcr-2* na literatura. Logo, a não ocorrência destes genes no presente estudo corrobora com a baixa ocorrência encontrada na literatura.

O grupo de antimicrobianos analisados neste trabalho é pequeno, não correspondendo a toda diversidade de drogas utilizada nas fazendas. Dentre as informações cedidas pelos proprietários, nos tratamentos com antimicrobianos foram utilizados, principalmente tetraciclina, neomicina, bacitracina, ceftiofur, cefoperazona e enrofloxacina.

Foi encontrado apenas um cluster nas fazendas 5, 7 e 8. Na fazenda 1, houve desde infecções simultâneas em animais diferentes, causadas pelo mesmo clone (cluster 0007) até infecções crônicas num único animal (cluster 0002). Casos de mastite clínica crônica causadas por *E. coli* são incomuns, embora já relatados (DÖPFER et al., 1998; BRADLEY e GREEN, 2001 e DOGAN et al., 2006). Este tipo de infecção está relacionado aos mecanismos da bactéria em evadir do sistema imune (DOGAN et al., 2006). Um destes mecanismos pode ser a produção de biofilme, o que condiz com o fato do único isolado deste estudo causador da forma crônica da doença ser um forte produtor de biofilme.

O resultado do agrupamento em clusters é reforçado pelo resultado dos grupos filogenéticos, já que todos os clusters foram formados por isolados do mesmo filogruppo. Porém, não foi encontrada a mesma relação para o agrupamento em clusters e produção de biofilme.

E. coli causadora de mastite clínica e produtora de biofilme já foi relatada anteriormente no Brasil (COSTA et al., 2014). O biofilme proporciona ambientes de resistência, tanto às ações mecânicas externas quanto aos antimicrobianos. Além disso, é um mecanismo de permanência no ambiente, com ocasionais destacamentos de células

que colonizarão outra superfície podendo formar outro biofilme. Mais da metade (57%) das amostras analisadas se mostraram produtoras de biofilme, o que poderia resultar em infecções recorrentes pelo mesmo clone.

O fato de terem tantas infecções nas fazendas, em especial na 1, onde foram encontrados 7 clusters diferentes, evidencia que os trabalhadores destes locais não estão realizando práticas adequadas de manejo do equipamento para ordenha e cuidados com a limpeza tanto dos equipamentos como do animal e ambiente. A ausência de fatores de virulência característicos formando um padrão para MPECs mostra que a maior parte das infecções está ocorrendo por bactérias que persistem no ambiente ao longo do tempo, pois alguns pulsotipos permaneceram no ambiente por mais de um ano (cluster 003).

6. CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

Código de campo alterado

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

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

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

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

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

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

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

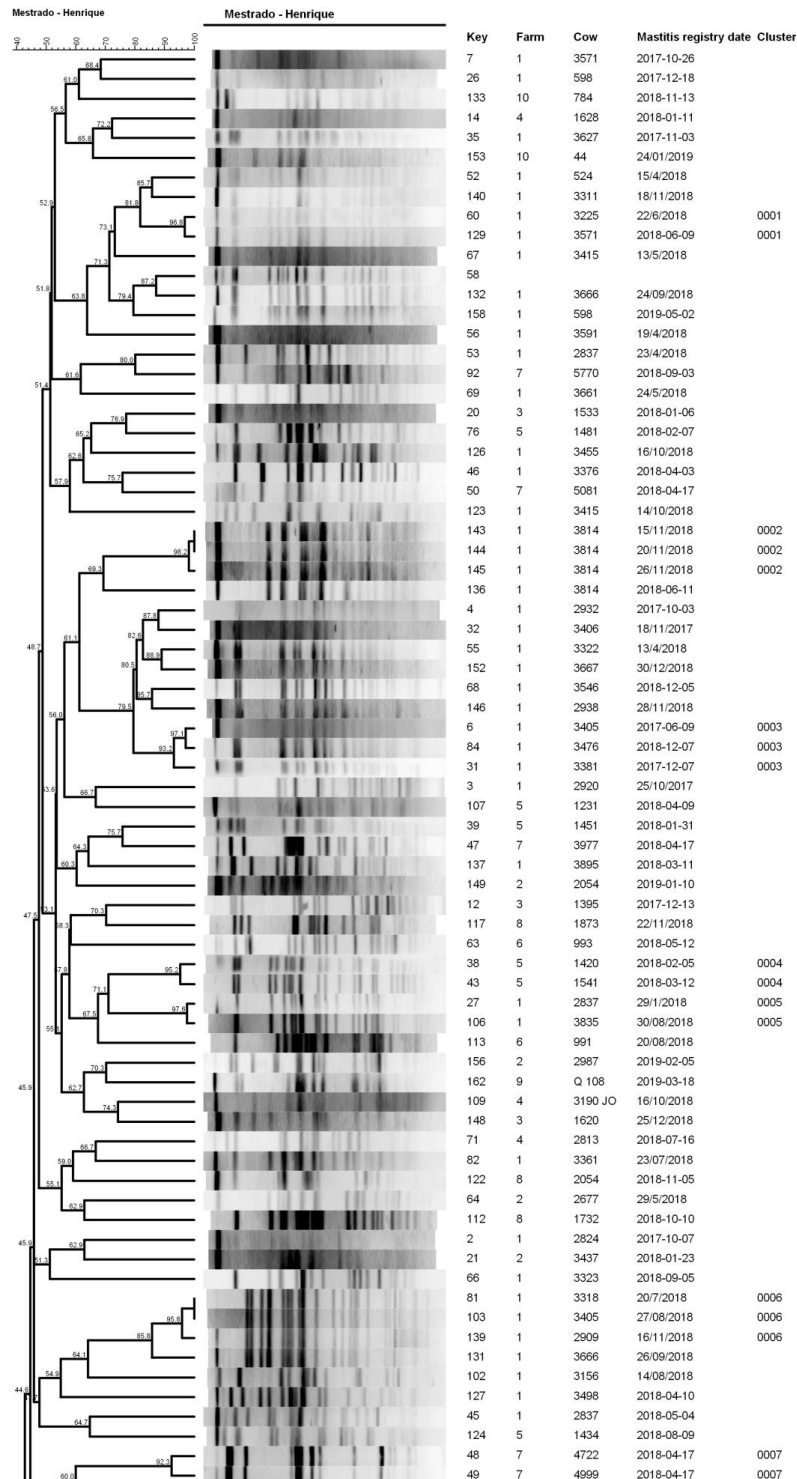
- 1519 ROGERS, B. A. et al. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant,
1520 community-associated strain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 1, p.
1521 1-14, 2011.
- 1522 RUEGG, P. L. New perspectives in udder health management. **Veterinary Clinics:**
1523 **Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 149-163, 2012.
- 1524 RUEGG, P. L. Making antibiotic treatment decisions for clinical mastitis. **Veterinary**
1525 **Clinics: Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 413-425, 2018.
- 1526 RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for
1527 extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of**
1528 **Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754, 2000.
- 1529 SAIDANI, M. et al. Epidemiology, antimicrobial resistance, and extended-spectrum
1530 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in clinical bovine mastitis in
1531 Tunisia. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 8, p. 1242-1248, 2018.
- 1532 SANTOS, M. V. Mastite bovina e o uso de antibióticos. **Mundo do leite**. p. 18-20,
1533 2013. Disponível em: [http://qualileite.org/pdf/Artigos-tecnicos-publicados-em-revista-](http://qualileite.org/pdf/Artigos-tecnicos-publicados-em-revista-de-divulgacao/Mundo-do-leite/2013/2.pdf)
1534 [de-divulgacao/Mundo-do-leite/2013/2.pdf](http://qualileite.org/pdf/Artigos-tecnicos-publicados-em-revista-de-divulgacao/Mundo-do-leite/2013/2.pdf) Acesso em 14 jun. 2019.
- 1535 SAVARINO, S. J. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1
1536 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proceedings of the National**
1537 **Academy of Sciences USA**, v. 90, p. 3093-3097, 1993.
- 1538 SCHEMBRI, M. A. et al. Capsule shields the function of short bacterial
1539 adhesins. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1249-1257, 2004.
- 1540 SCHMIDT, H. et al. Development of PCR for screening of enteroaggregative
1541 *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 701-705, 1995a.
- 1542 SCHULTSZ, C. et al. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by
1543 using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. **Journal of**
1544 **Clinical Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 2393-2397, 1994.
- 1545 SELLERA, Fábio P. et al. Identification of KPC-2-producing *Escherichia coli* in a
1546 companion animal: a new challenge for veterinary clinicians. **Journal of Antimicrobial**
1547 **Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2259-2261, 2018.

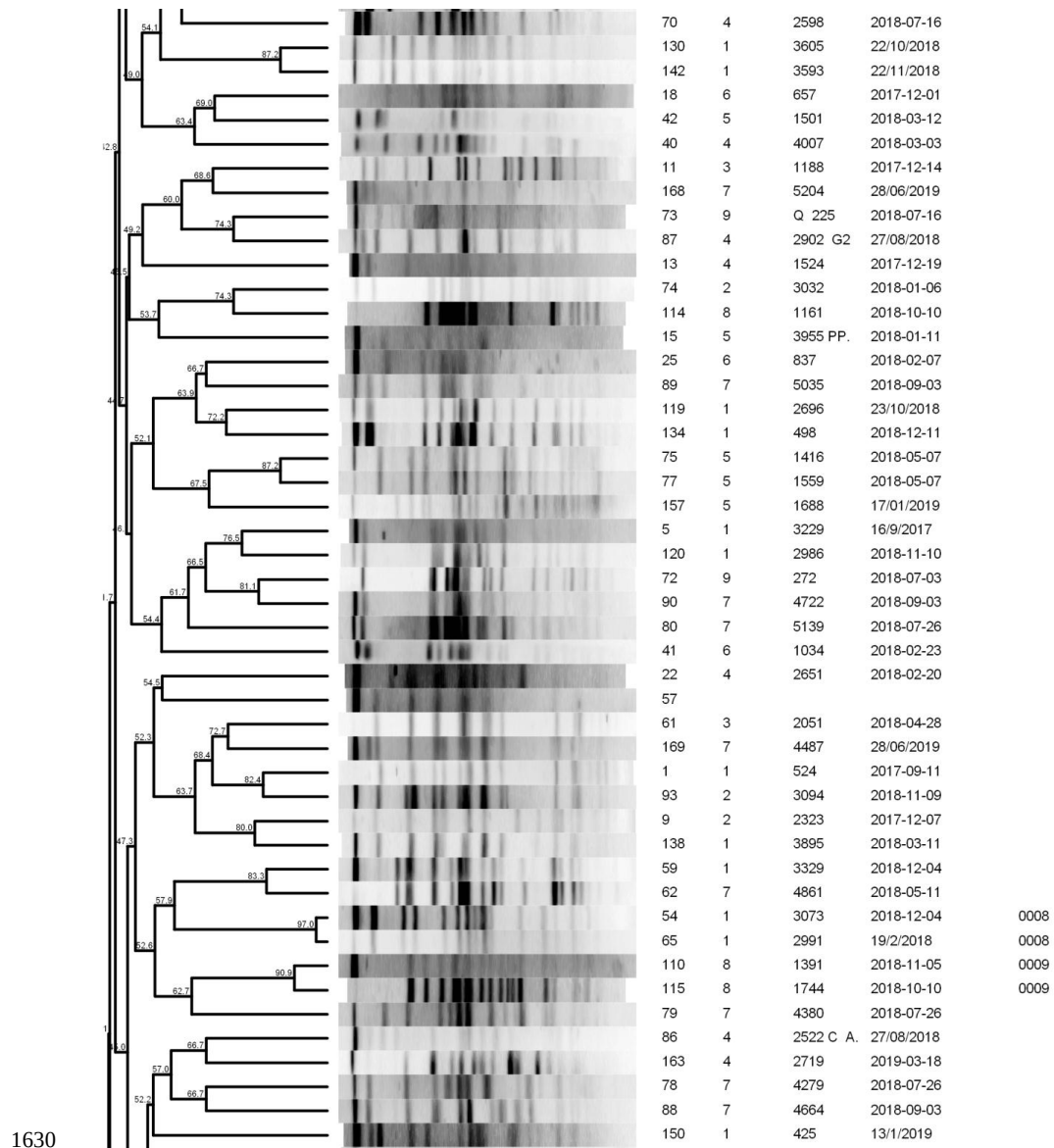
- 1548 SEPPÄLÄ, H. et al. The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics
1549 on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. **New England Journal**
1550 **of Medicine**, v. 337, n. 7, p. 441-446, 1997.
- 1551 SHARMA, G. et al. *Escherichia coli* biofilm: development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

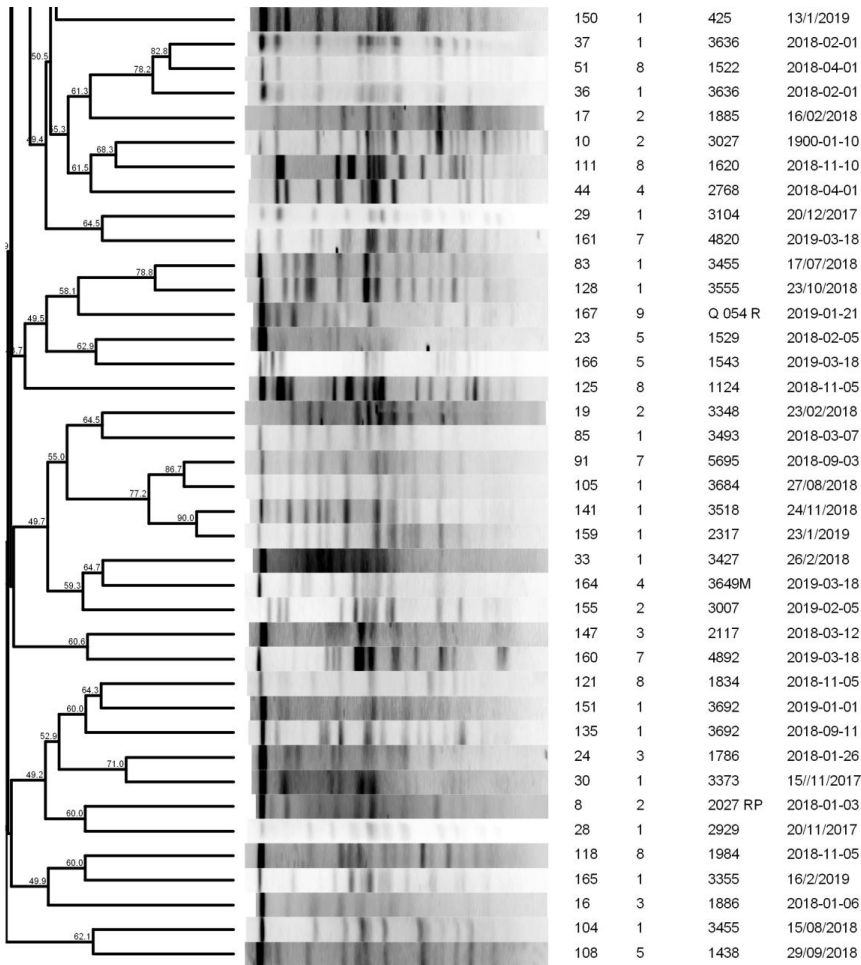
- 1579 TOMA, C. et al. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga
1580 toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p.
1581 4937-4946, 2004.
- 1582 TOMAZI, T. et al. Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical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

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

1627 ANEXO 1 – Dendograma gerado pela análise de PFGE de 161 *Escherichia coli* isoladas
 1628 de mastite clínica bovina.





0010
0010