UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, PERFIL DE SENSIBILIDADE E PRODUÇÃO DE BIOFILME DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE TANQUES DE EXPANSÃO DE LEITE BOVINO

Samea Fernandes Joaquim

Botucatu - SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, PERFIL DE SENSIBILIDADE E PRODUÇÃO DE BIOFILME DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE TANQUES DE EXPANSÃO DE LEITE BOVINO

Samea Fernandes Joaquim

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de doutora.

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni
Co-orientador: Dr. Felipe de Freitas Guimarães

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

Joaquim, Samea Fernandes.
Caracterização molecular, perfil de sensibilidade e produção de biofilme de Escherichia Coli isoladas de tanques de expansão de leite bovino / Samea Fernandes Joaquim. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Helio Langoni
Coorientador: Felipe de Freitas Guimarães
Capes: 50502000

1. Escherichia coli. 2. Saúde pública. 3. Segurança alimentar. 4. Biofilmes. 5. Leite - Qualidade. 6. Resistência microbiana a medicamentos.

Palavras-chave: Bactérias; Multirresistência a antimicrobianos; Saúde pública; Segurança dos alimentos.

Nome do autor: Samea Fernandes Joaquim

Título: Caracterização molecular, perfil de sensibilidade e produção de biofilme de *Escherichia coli* isoladas de tanques de expansão de leite bovino

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélio Langoni
Presidente e orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Membro Titular
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira
Membro Titular
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Ricardo Seiti Yamatogi
Membro Titular
Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite
Membro Titular
Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia – Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dra. Simone Baldini Lucheis
Membro Suplente
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dra. Elizabeth Oliveira Costa
Membro Suplente
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – FMVZ USP

Prof. Dra. Amanda Keller Siqueira
Membro Suplente
Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO

Data da Defesa: 17 de fevereiro de 2020.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu avô Nelson Joaquim (in memorian), grande incentivador dos estudos de toda a família.

“A modificação, para a melhora da sociedade humana como um todo, terá de provir das ideias emanadas dos grandes homens, impressas na luz astral, que promoverão a modificação dos homens e, por seus atos, a sociedade. Tudo o que existe está escalonado numa sequência de vibrações harmônicas, da energia princípio para a causa final”.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de Doutorado Direto concedida (Processo 2017/07246-6) e Auxílio à Pesquisa – Projeto Temático (Processo 2015/19688-8).

Agradeço à Faculdade de Medicina de Veterinária e Zootecnia FVMZ UNESP pelas condições e infra-estrutura para viabilizar a execução deste projeto, além de ser minha segunda casa desde 2009 e tornar tantos sonhos ora imaginados, hoje possíveis.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço a Deus, por garantir todo o discernimento e bençãos recebidos durante minha vida.

Agradeço aos meus Pais, Sérgio Fernandes Joaquim e Ana Maria Gomes Joaquim, e minha irmã, Bianca Fernandes Joaquim por serem meus alicerces inabaláveis em todo o meu caminho, meus maiores incentivadores e que não mediram esforços para que cada passo realizado fosse possível. Amo vocês.

Agradeço aos meus três grandes exemplos de veterinários de minha família, Celso Fernandes Joaquim, Jean Guilherme Fernandes Joaquim e Reinaldo José Rodrigues, vocês são minhas inspirações profissionais.

Agradeço toda a minha família em especial meus avós Nelson Joaquim (in memorian), Elisa de Lourdes Fernandes Joaquim, Sebastião Raimundo Gomes (in memorian) e Aparecida Custódio Gomes, e também meus padrinhos Telma Fernandes Joaquim Rodrigues, Reinaldo José Rodrigues e Karina Rodrigues Nardini Gomes pelo incentivo ao longo de toda minha vida.

Agradeço ao meu Orientador, Professor Helio Langoni, por todo o conhecimento repassado, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa em 2011, ainda como aluna de iniciação científica, por todas orientações sejam essas no âmbito profissional, como também pessoal e por toda a paciência ao longo desses anos.

Agradeço ao meu Co-orientador, Felipe de Freitas Guimarães , por cada ensinamento, por cada força e imprescindível ajuda ao longo da execução deste e de

tantos outros trabalhos e, sobretudo, agradeço a amizade.

Agradeço às minhas amigas e companheiras de casa ao longo desses anos de pós graduação, Natalia Moraes Dias, Mayra de Castro Ferreira Lima, Giulia Soares Latosinski, Tatiana Geraissate Gorenstein e Natalie Neuwirt Oliveira por todo apoio, amizade e momentos compartilhados.

Agradeço aos meus amigos de graduação que independente da distância permanecem sempre comigo, dividindo momento felizes, Natalia Sato Minami, Jhônatas Kuhn, Annalú Pinton Ferreira e Fabiana Pighini Orlando.

Agradeço às duas grandes amigas e parceiras em diferentes momentos da pós graduação, Talita Gomes da Silva Batista e Maysa Pelizzaro, que foram as irmãs que pude escolher ao longo dessa trajetória.

Agradeço aos meus amigos do Núcleo de Pesquisa em Mastites e Núcleo de Pesquisa em Zoonoses por todo apoio, colaboração na execução deste trabalho, e ainda, todos os momentos felizes que passamos juntos, Simony Trevizan Guerra, Felipe Morales Dalanezi, Felipe Fornazari, Karine Bott Mantovan, Ana Carolina Yamakawa Bruna Churocof Lopes, Evelyn Cristine Silva, Amanda Bezerra Bertolini, Nássarah Jabur Lot Rodrigues, Marcela de Pinho Manzi, Benedito Donizete Menozzi e Pâmela Merlo Marson.

Agradeço aos meus amigos e incentivadores diários para realização deste sonho, Paulo Henrique Scalada, Carlos Augusto Pires Arruda, Djandira do Nascimento, Letícia Fernanda de Castro Silva e Rodolfo Guilherme Mendonça.

Agradeço a todos os docentes e colaboradores do projeto temático do qual este trabalho faz parte, por toda ajuda no desenvolvimento desta tese de doutorado, em especial ao Professor Márcio Garcia Ribeiro, por todas as elucidações de dúvidas e ao Professor José Carlos de Figueiredo Pantoja pelo auxílio com as análises estatísticas.

A todos vocês, o meu muito obrigada, pois este trabalho não é somente meu, é de todos nós, o qual tenho a honra de apresentá-lo para obtenção deste título.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Genes de produção de biofilme e sequências dos iniciadores empregados nas reações de PCR..... 23

QUADRO 2. Sequência dos oligonucleotídeos empregados para detecção dos genes de produção de ESBLs..... 23

QUADRO 3. Genes de virulência e sequências dos iniciadores usados na pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* extraintestinal (ExPEC)..... 24

QUADRO 4. Genes de virulência e sequências dos iniciadores empregados nas reações de PCR para a pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* diarreiogênicas..... 25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Principais características de produção, rebanho bovino e instalações das fazendas estudadas. Botucatu, SP, 2020..... 16

TABELA 2. Principais características de manejo de ordenha de vacas nas fazendas estudadas. Botucatu, SP, 2020..... 17

TABELA 3. Perfil de sensibilidade *in vitro* (método de difusão em discos) em *E. coli* isolados de tanques de expansão. 27

TABELA 4. Prevalência da produção de biofilme em poliestireno, inox e silicone a partir de isolados de *E. coli* obtidos de amostras de leite de tanques de expansão. Botucatu, 2020..... 28

TABELA 5. Sensibilidade dos isolados de *E. coli* formadores de biofilme em poliestireno a iodo e digluconato de clorexidina após a indução de formação do biofilme com 72h de incubação. FMVZ UNESP, Botucatu, 2020..... 29

TABELA 6. Reação em cadeia da polimerase de isolados de *E. coli* oriundos de leite bovino de tanque de expansão para detecção de genes relacionados à produção de biofilme e produção de ESBLs. FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020... 30

TABELA 7. Reação em cadeia da polimerase de isolados de *E. coli* oriundos de leite bovino de tanque de expansão para detecção de genes relacionados à pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* extraintestinal (ExPEC). FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020..... 31

TABELA 8. Reação em cadeia da polimerase de isolados de *E. coli* oriundos de leite bovino de tanque de expansão para detecção de genes relacionados à pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* diarreiogênicas. FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020..... 32

TABELA 9. Associação dos genes relacionados com a produção de biofilme com a produção *in vitro* de biofilme em poliestireno, inox e silicone de isolados de *E. coli* obtidos de leite de tanques de expansão. FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020..... 32

TABELA 10. Associação dos genes relacionados com a produção de fatores de virulência em *E. coli* extra-intestinais (ExPEC) com a produção *in vitro* de biofilme em poliestireno, inox e silicone de isolados obtidos de leite de tanques de expansão. FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020..... 33

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Pesquisa fenotípica de ESBL pelo teste de disco-difusão. NUPEMAS, FMVZ, UNESP, 2020..... 21

FIGURA 2. Ficha de silicone utilizada na verificação da produção de biofilme em inox. NUPEMAS, FMVZ, UNESP, 2020..... 22

FIGURA 3. Pesquisa fenotípica de ESBL pelo teste de disco-difusão. NUPEMAS, FMVZ, UNESP, 2020..... 28

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
E. coli	*Escherichia coli*
EPS	exopolissacarídeos
ESBL	enzima β-lactamase de espectro extendido
IRMA	índice de resistência múltipla aos antimicrobianos
STEC	*Escherichia coli* produtora de shiga-like toxina
UHT	ultra high temperature
VTEC	*Escherichia coli* verotoxigênica
ECP	*E. coli* common pilus
SUH	Síndrome urêmica hemolítica
LPS	lipopolissacarídeos
EPEC	*E. coli* enteropatogênica
ETEC	*E. coli* enterotoxigênica
EIEC	*E. coli* enteroinvasora
EHEC	*E. coli* enterohemorrágica
EAEC	*E. coli* enteroagregativa

Sumário

RESUMO 12
ABSTRACT 13
1. INTRODUÇÃO 2
2. REVISÃO DE LITERATURA 5
2.1. Qualidade do leite 5
2.2. Biofilmes 6
2.3. Resistência bacteriana aos antimicrobianos 8
3. OBJETIVOS 12
3.1. Geral 12
3.2. Específicos 12
4. MATERIAL E MÉTODOS 14
4.1. Cálculo do número de amostras 14
4.2. Amostras 14
4.3. Análise microbiológica 18
4.4. Teste de disco-difusão para avaliação da sensibilidade in vitro aos antimicrobianos e obtenção do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos – IRMA 18
4.5. Teste de disco-difusão para investigação de *E. coli* produtora da enzima β-lactamase de espectro extendido(ESBL) 19
4.6. Verificação e quantificação da produção de biofilme em plástico de poliestireno, inox esilicone 19
4.7. Teste de sensibilidade a desinfetante na presença de biofilme 21
4.8. Realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dosisolados 22
4.9. Análise estatística 25
5. RESULTADOS 27
5.1. Teste de disco-difusão para avaliação da sensibilidade in vitro aos antimicrobianos e obtenção do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos – IRMA 27
5.2. Teste de disco-difusão para investigação de *E.coli* produtora da enzima β-lactamase de espectro extendido (ESBL) 28
5.3. Verificação e quantificação da produção de biofilme em plástico de poliestireno,inox e silicone 28
5.4. Teste de sensibilidade a desinfetante na presença de biofilme 29
5.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos isolados 30
6. DISCUSSÃO 37
6.4. Fatores de virulência em *E. coli* extraintestinais (ExPEC) 46
6.5. Fatores de virulência em *E. coli* diarreiogênicas 47
7. CONCLUSÕES 50
8. REFERÊNCIAS 52
9. ANEXOS 65
10. Artigo científico 67

RESUMO

JOAQUIM, S.F. Caracterização molecular, perfil de sensibilidade e produção de biofilme de *Escherichia coli* isoladas de tanques de expansão de leite bovino. Botucatu – SP, 2020, p.87. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Os coliformes encontrados no leite podem ser de origem animal em casos de mastites ou provenientes de falhas na obtenção higiênica do leite. Estudos moleculares para identificação de estirpes de *Escherichia coli* em tanques de expansão são incipientes. Dessa maneira, o presente estudo indentificou os isolados de *E. coli* presentes em tanques de expansão de propriedades leiteiras, bem como genes associados a fatores de virulência, genes envolvidos na formação de biofilmes e pesquisa de genes de isolados produtores da enzima β-lactamase de espectro extendido (ESBL), além de estudos fenotípicos de multirresistência a antimicrobianos e formação de biofilmes em diferentes materiais. Foram isoladas 149 amostras de *E.* coli, dentre as quais, 24,2% obtiveram índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) >0,3. Quanto a formação de biofilmes, 42,28% dos isolados produziram em plástico de poliestireno, 21,48% em inox e 56,38% em silicone. Quanto à susceptibilidade dos produtores de biofilme ao iodo e digluconato de clorexidine, esses desinfetantes foram capazes de inibir a formação de biofilme, porém tiveram seu efeito diminuído em 25,40% das amostras após a formação do biofilme maduro. Foram detectados genes relacionados com a produção de biofilme, entretanto os genes de *E. coli* common pilus mostraram associação negativa com a produção fenotípica nos materiais analisados ($p<0,05$). Genes de *E. coli* extra-intestinais foram encontrados para adesinas, toxinas, sideróforos e de resistência ao soro. Não foram encontrados genes correlacionados com fatores de virulência de *E. coli* diarreiogênicas.Diante dos resultados obtidos, anseia-se aprofundar o conhecimento desse patógeno, a fim de possibilitar estratégias de controle para melhoria da qualidade do leite de tanques de expansão, visando à saúde pública.

Palavras-chaves: Bactérias, multirresistência a antimicrobianos, saúde pública, segurança dos alimentos.

ABSTRACT

JOAQUIM, S.F. Molecular characterization, sensitivity profile and biofilm production from bulk tank milk *Escherichia coli*. Botucatu – SP, 2020, p.87. Tese (Doutorado) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, Sao Paulo State University –UNESP.

Coliforms found in milk can be of animal origin in cases of mastitis or from faults in the hygienic production of milk. Molecular studies to identify *Escherichia coli* strains in expansion tanks are incipient. Thus, the aim of this study were identify *E. coli* isolates in dairy expansion tanks, genes associated with virulence factors and involved in biofilms formation and identify genes from isolates producers of extended spectrum β-lactamase (ESBL), as well as phenotypic studies of antimicrobial multiresistance and formation of biofilms in different materials. 149 E. coli samples were isolated, among which, 24.2% obtained a multiple antimicrobial resistance index (IRMA)> 0.3. As for the formation of biofilms, 42.28% of the isolates produced in polystyrene plastic, 21.48% in stainless steel and 56.38% in silicone. As for the susceptibility of biofilm producers to iodine and chlorhexidine digluconate, these disinfectants were able to inhibit the formation of biofilm, but their effect was reduced in 25.40% of the samples after the formation of the mature biofilm. Genes related to biofilm production were detected, however *E. coli* common pilus genes showed a negative association with phenotypic production in the analyzed materials ($p<0.05$). Extra-intestinal *E. coli* genes have been found for adhesins, toxins, siderophores and serum resistance. No genes were found that correlated with diarrhogenic*E. coli* virulence factors. Before the results obtained, it is hoped to deepen the knowledge of this pathogen, in order to enable control strategies to improve the quality of milk in expansion tanks, aiming at public health.

Keywords: Antimicrobial multiresistance, bacteria, food safety, public health.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

É notória a preocupação mundial com a qualidade do leite oferecido para o consumo. A qualidade do leite é considerada muito boa em certos países desenvolvidos. Entretanto, no Brasil, apesar dos avanço sobtidos, boa parte do leite ainda é produzido aquém das condições de qualidade. As Instruções Normativas nº 76 e 77/2018 são as legislações vigentes que regulamentam a produção leiteira no país, garantindo a segurança desse alimento nas diferentes etapas da cadeia produtiva (BRASIL, 2018a, 2018b). A manutenção do leite produzido, em tanques refrigeradores, com temperatura até 4°C, limita a multiplicação de micro- organismos mesófilos e a produção de toxinas de psicrotróficos presentes no leite. Altas contagens bacterianas estão diretamente associadas a temperaturas superiores a 4,1°C, indicando falhas na higiene da ordenha (BUENO et al., 2004), ou, ainda, devido a ocorrência de mastites, sejam de origem contagiosa ou ambiental (LANGONI, 2013).

A presença de coliformes no leite, incluindo *Escherichia coli* de acordo com o limite estabelecido, garante a eficácia da inativação dos micro-organismos durante a pasteurização. No entanto, quando ocorrem falhas na pasteurização do leite, ou mesmo após o consumo do produto cru, os humanos podem ser expostos a riscos de doenças (GUH et al., 2010). A presença de *Escherichia coli* produtora de shiga toxina ou verotoxina (STEC/VTEC), responsável pela síndrome urêmica hemolítica e colite hemorrágica, tem sido relatada em isolados recuperados do leite de vacas armazenado em tanques de expansão (JAYARAO et al., 2006). Surtos de colite hemorrágica, causados pelo sorotipo *E. coli* O157:H7, tem sido relatados em queijo produzido com leite não pasteurizado (HONISH et al., 2014) ou pelo consumo de leite cru (KEENE et al., 2009). Certos isolados de *E. coli* são capazes de aderir, colonizar e formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, possibilitando a sobrevivência do patógeno em ambientes hostis (WANG et al., 2012a).

A produção da enzima β-lactamase de espectro extendido (ESBL) é considerada o principal fator de resistência das bactérias gram-negativas a fármacos β-lactâmicos. Essas enzimas, clavulanato suscetíveis mediada por plasmídeos, conferem as bactérias resistência as cefalosporinas de terceira e quarta gerações. Linhagens produtoras de ESBLs são reconhecidas como

problema de Saúde Pública, pela associação com surtos e altas taxas de morbimortalidade em humanos (POIREL; BONNIN; NORDMANN, 2012).

Estudos moleculares para identificação de *E. coli* em tanques de expansão são praticamente incipientes no Brasil, bem como o perfil clonal dos isolados. O aumento da resistência dos patógenos aos antimicrobianos, apontam para a premência de se investigar o perfil de sensibilidade de bactérias isoladasde leite de tanques de expansão. A comparação genotípica entre estirpes de *E. coli* pode possibilitar a identificação de grupos clonais distintos, norteando estudos de marcadores específicos dos fatores de virulência, sensibilidade e/ou resistência aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento da mastite em vacas na lactação ou no período seco. Ademais, pouca atenção tem sido despendida com a qualidade higiênico-sanitária do leite de tanques de resfriamento, bem como a pesquisa de bactérias formadoras de biofilme em tanques de expansão.

Revisão de literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Qualidade do leite

O leite é um alimento fundamental na dieta humana, uma vez que fornece proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e sais minerais. Há, portanto,grande preocupação em assegurar a integridade e a qualidade intrínseca do leite e dos produtos lácteos destinados ao consumo humano (FAGUNDES; FERNANDES OLIVEIRA, 2004). Produtos lácteos são utilizados na alimentação de crianças e idosos, o que exige atenção maior quanto a qualidade do produto. A qualidade do leite é determinada por toda a cadeia do processo produtivo, ou seja, desde a sanidade dos animais, processo higiênico de obtenção, bem como, a efetividade do processamento térmico empregado nos laticínios.

Para manter a qualidade nutricional e os padrões sanitários para oconsumo do leite deve se considerar a saúde dos animais envolvidos em sua produção. O principal problema nos rebanhos leiteiros que afeta essa qualidade, e que causa prejuízos econômicos significativos ao produtor, é a mastite (LANGONI et al., 2009), definida como inflamação da glândula mamária, de origem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica e principalmente infecciosa (COSTA et al., 1998).

Quanto à etiologia do processo infeccioso, os micro-organismos são classificados em dois grupos: os contagiosos, que se disseminam entre os animais durante a ordenha; e os ambientais, geralmente presentes no meio ambiente, que invadem a glândula pelo canal galactófaro, principalmente nas entre ordenhas (LANGONI et al., 2009).

A mastite causada por micro-organismos ambientais é favorecida por uma série de elementos, tais como manejo dos animais, temperatura e, até mesmo, índices pluviométricos, o que eleva a complexidade desses patógenos e dificulta as ações de controle e profilaxia (RIBEIRO et al., 2008).

Quando avalia-se isolados bacterianos provenientes de tanque de expansão, prevê-se que a origem dos mesmos pode ser tanto de leite de vacas com mastite, principalmente subclínica, ou mastite clínica erroneamente destinada ao tanque (ao invés do recomendado descarte), como, também, a eficiência de higienização do tanque e equipamentos deordenha.

Além das perdas econômicas, devido à diminuição de produção e perda de qualidade do leite, os aspectos de saúde pública também merecem destaque, pois pode ocorrer tanto a transmissão de agentes patogênicos, como também de suas toxinas, causadoras de toxiinfecções alimentares (DE FREITAS GUIMARÃES et al., 2013; SÁ et al., 2004).

O comércio informal de leite é proibido no Brasil desde 1969 (BRASIL, 1969). Porém, estima-se que cerca de um terço da produção nacional de leite é comercializada informalmente, sem tratamento térmico atribuído ao produto e inspeção sanitária oficial. O leite pode representar uma importante via de disseminação de doenças veiculadas por alimentos, posto que, sem tratamento adequado, pode veicular uma série de micro-organismos patogênicos (NERO; MAZIERO; BEZERRA, 2003). Sabe-se que notória parcela da população ainda consome leite cru, seja por opção atribuída a características organolépticas, pela errônea associação com hábitos alimentares mais saudáveis, a qual é amplamente difundida nos dias atuais (CLAEYS et al., 2013), ou, ainda, o grande consumo pelos trabalhadores e moradores de propriedades leiteiras (JAYARAO et al., 2006).

Dentre os 2403 surtos por enfermidades oriundas de alimentos registrados no Brasil entre os anos de 2009 e 2018, cujos alimentos causadores da enfermidade foram identificados, 7,9% deles são atribuídos ao leite ou derivados lácteos. Quanto ao agente patogênico associado aos surtos, *E. coli* é o patógeno com maior número de registros (24%), independentemente do alimento associado (BRASIL, 2019).

2.2. Biofilmes

Biofilmes podem ser definidos como comunidades de células sésseis, constituídas por uma ou várias espécies bacterianas, inclusas em uma matriz de polímeros extracelulares (exopolissacarídeos - EPS) e aderidas em uma superfície inerte ou viva (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Ainda os micro-organismos podem exibir diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Os biofilmes apresentam etapas de formação, as quais compreendem: (i) uma fixação inicial reversível de bactérias em sua forma planctônica, as quais se aproximam de uma superfície, seja por meio de auxílio de uma corrente fluida ou por motilidade dos micro-organismos; (ii) Posteriormente, há uma transição da ligação reversível para irreversível, seja pela produção de polímeros extracelulares ou por adesinas específicas localizadas em pili e fímbrias das bactérias, os quais interagem com a superfície; (iii) Desenvolvimento precoce da arquitetura do biofilme; (iv) Desenvolvimento de microcolônias no biofilme maduro, em que as substâncias poliméricas extracelulares, além de servirem como matriz adesiva do biofilme,passamacapturarnutrientesparaamanutençãodomesmo.Nessaetapa é possível observar uma arquitetura complexa, com formação de canais de águaeporos; Além disso, as células passam para um estado séssil, diferentemente da forma planctônica, e desenvolvem fisiologia, metabolismo e padrão de multiplicação diferente; (v) Dispersão de células do biofilme ao meio circundante e retorno das mesmas ao estado planctônico (VAN HOUDT; MICHIELS, 2005).

Os biofilmes que se desenvolvem em ambientes naturais e industriais são frequentemente resistentes a vários biocidas quimicos utilizados para combater a incrustação biológica em processos industriais (COSTERTON et al., 1995). Dessa maneira, os biofilmes representam um problema dentro da propriedade, em virtude de impedir a ação de agentes desinfetantes no equipamento de ordenha, liberando constantemente micro-organismos e propiciando novas infecções aos animais. Ainda no ambiente industrial, podendo levar, inclusive, a contaminação do leite pós tratamento térmico, como a pasteurização eUHT.

Os mecanismos de resistência dos biofilmes são complexos. Células bacterianas sésseis podem resistir a resposta imune do hospedeiro e são menos sensíveis a antimicrobianos do que suas contrapartes planctônicas individuais não ligadas. Outra possibilidade éa falha de um agente em penetrar em toda a profundidade do biofilme. Substâncias poliméricas como aquelas que compõem a matriz de um biofilme são conhecidas por retardar a difusão de antimicrobianos (ISHIDA et al., 1998). É possível prever, por meio da utilização de modelos matemáticos, que uma excelente barreira de penetração nos biofilmes deve ser formada se o agente antimicrobiano for desativado nas camadas externas do biofilme mais rapidamente do que se difunde (STEWART; RAQUEPAS, 1995). Tal

hipótese é verdadeira para oxidantes reativos, como o hipoclorito e o peróxido de hidrogênio. Esses oxidantes antimicrobianos são produtos da explosão oxidativa de células fagocíticas e a penetração deficiente de espécies reativas de oxigênio pode explicar parcialmente a incapacidade das células fagocíticas de destruir micro-organismos de biofilme (LIU et al., 1998).

Outro mecanismo de resistência do biofilme a antimicrobianos tem como fundamentação que pelo menos algumas das células em um biofilme experimentam limitação nutricional e, portanto, existem em estado de crescimento lento. Células de crescimento lento, ou não crescentes, não são muito susceptíveis a muitos agentes antimicrobianos. Ainda, é sabido que na grande maioria das vezes o biofilme é multiespécie e possui grande heterogeneidade, apresentando células de estados metabólicos diferentes, que quase certamente sobreviverão a qualquer ataque dirigido metabolicamente (BROWN; ALLISON; GILBERT, 1988).

Outro mecanismo de diminuição de sensibilidade do biofilme a antimicrobianos é que algumas das células de um biofilme adotam fenótipo distinto e protegido. Esse fenótipo não é uma resposta à limitação de nutrientes, mas biologicamente programada ao crescimento em uma superfície (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

2.3. Resistência bacteriana aos antimicrobianos

As mastites causadas por patógenos ambientais são predominantes em rebanhos com alto grau de tecnificação e de bom manejo. O perfil de resistência a antimicrobianos desses micro-organismos refletem a situação geral de resistênciado rebanho (NAM et al., 2009a), os quais vem se preocupando a comunidade científica por apresentarem grande resistência aos antimicrobianos e serem considerados responsáveis por surtos de doenças transmitidas por alimentos em humanos (NAM et al., 2009b).

A presença de genes de resistência na estirpe bacteriana aumenta seu espectro de resistência e sua probabilidade de disseminação, o que justifica a importância de estudos da prevalência de isolados resistentes (PFALLER;

SEGRETI, 2006).

A colonização de úberes de vacas sadias com patógenos de caráter zoonótico multirresistentes aos antimicrobianos durante a lactação ou período seco é importante ameaça que afeta tanto a indústria de laticínios, como também a saúde pública (HAMMAD et al., 2008).

Coliformes são considerados patógenos indicadores de contaminação ambiental e possuem maior contato com populações bacterianas dentro de um ambiente, o que facilita a troca de material genético como os plasmídeos, sugerindo que a resistência de origem cromossômica se origina no solo e ambiente (HAMMAD et al., 2008).

Tratamentos sistêmicos resultam em excreção de resíduos de antimicrobianos pelas fezes, urina e leite dos animais, o que leva ao acúmulo desses fármacos no solo habitado por animais produtores de leite. É possível que a pressão antibiótica ambiental selecione algumas mutações pontuais que podem ocorrer no cromossomo ou por meio de plasmídeo codificado. Este tipo de ambiente favorece o surgimento de resistência, transferência de genes e amplificação de cepas resistentes. Estes patógenos multirresistentes podem, em condições adequadas, infectar a glândula mamária. Micro-organismos resistentes foram encontrados tanto em fazendas convencionais como orgânicas, o que demonstra quão difundido o fenômeno da resistência bacteriana está nas fazendas (ROESCH et al., 2006). É de se esperar que cepas resistentes se espalhem ainda mais entre os animais produtores de alimentos e, portanto, constituem um reservatório e podem causar problemas para os seres humanos (HAMMAD et al., 2008).

A antibioticoterapia é uma das principais abordagens no controle da mastite, seja em vacas em lactação ou vacas no período seco. A terapia da vaca secaéadotadamundialmente,principalmentecomprincípiosβ-lactâmicoscomoas penicilinas (RAJALA-SCHULTZ et al., 2004) e se constitui no único procedimento de uso profilático de antimicrobianos ainda permitido em animais de produção.

Muitos gêneros de bactérias gram-negativas possuem uma β-lactamase de ocorrência natural, mediada por cromossomos. Acredita-se que estas enzimas tenham evoluído a partir das proteínas de ligação à penicilina, com as quais elas

mostram alguma homologia de sequência (GHUYSEN, 1991). A produção de enzimas β-lactamases é o principal mecanismo de resistência aos antibióticos β-lactâmicos em bactérias Gram-negativas. Os tratamentos excessivos e mal conduzidos com β-lactâmicos são apontados como responsáveis pelo aumento da incidência de bactérias produtoras de β-lactamases (BRADFORD, 2001).

Muitos antibióticos novos-lactâmicos foram desenvolvidos especificamente para serem resistentes à ação hidrolítica das β-lactamases, tais como as oximino-cefalosporinas (cefalosporinas de terceira geração). Porém, uma nova classe de enzimas foi relatada, capazes de hidrolisar até mesmo estes novos antimicrobianos. Estas enzimas são conhecidas como β-lactamases de espectro extendido (ESBLs), derivadas de β-lactamases comuns (BRADFORD, 2001).

As β-lactamases de espectro extendido (ESBLs) são enzimas bacterianas mediadas por plasmídeos que são capazes de hidrolisar uma grande variedade de penicilinas e cefalosporinas. A maioria das ESBLs evoluiu por mutação genética a partir de β-lactamases comuns, particularmente TEM-1, TEM-2 e SHV-1. Um número limitado de mutações é suficiente para converter uma β-lactamase comum em uma ESBL (PFALLER; SEGRETI, 2006).

A maioria das ESBLs é derivada das β-lactamases TEM ou SHV, outras podem ser categorizadas como uma das famílias mais novas de ESBLs, tal como CTX-M,ealgumasESBLsqueforamrelatadasnãoestãointimamenterelacionados com nenhuma das famílias estabelecidas β-lactamases (BRADFORD, 2001).

As ESBLs são encontradas em diversos países (PATERSON et al., 2003). Porém, como as cepas produtoras de ESBL geralmente surgem em focos, sua prevalência pode variar muito de um local para outro e até mesmo ao longo do tempo para um determinado local. Como resultado, estimativas regionais e locais são provavelmente mais úteis para a tomada de decisões clínicas do que as avaliações globais (PFALLER; SEGRETI, 2006).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar a presença de *E. coli* isoladas do leite de tanques de expansão em dez propriedades leiteiras de alta produção, localizadas nos Estados de São Paulo e Minas Gerais.

3.2. Específicos

Avaliar o perfil de sensibilidade “in vitro” dos isolados diante de antimicrobianos disponíveis para o tratamento da mastite bovina na lactação e período seco;

Detectar genes de virulência associados a cepas patogênicas de *E. coli* que causam doenças intestinais e extraintestinais em humanos, pela técnica de PCR;

Investigar os principais genes envolvidos na formação de biofilme nos isolados;

Detectar os principais genes de isolados produtores de ESBLs;

Verificação e quantificação da produção de biofilme em diferentes materiais presentes nas linhas de ordenha (plástico de poliestireno, aço inox e silicone);

Investigar a ação *in vitro* de desinfetantes na presença de biofilme por *E. coli.*

Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado na Câmara de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ – UNESP/Botucatu, SP, como subprojeto (Processo FAPESP nº 2017/07246-6) vinculado ao projeto temático (Processo FAPESP nº 2015/19688-8) intitulado: *"E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus* spp.: Impacto dos fatores de virulência na mastite bovina e reflexos na saúde pública", sob o protocolo número 0136/2017, cujo atestado encontra-se anexado a este documento (Anexo1).

4.1. Cálculo do número de amostras

O cálculo amostral foi baseado na estimativa da população de vacas no ambiente amostrado e com a frequência antecipada dos diferentes fatores de virulência em *E. coli* de 5% e intervalo de confiança de 95%. Com base nestas condições, o valor mínimo de *E. coli* necessário para o desenvolvimento do estudo é de 73 isolados (Openepi.com Versão 3.01: https://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm).

4.2. Amostras

Foram avaliadas amostras de leite de tanques de expansão, provenientes de coletas em dez propriedades leiteiras localizadas no interior do Estado de São Paulo e Minas Gerais. Os rebanhos dessas propriedades possuem em comum programas de controle de mastite (com registros de dado sem softwares de gerenciamento), contagem de células somáticas (CCS) < 400.000 cs/mL, raças holandesas de alta produção > 20 litros/vaca/dia, com no mínimo de 200 vacas em lactação, em regime de ordenhamecânica.

As dez fazendas selecionadas localizavam-se 06 no sul do Estado de Minas Gerais (propriedades A, B, C, D, E e F) e 4 situadas no sudoeste do Estado de São Paulo (propriedades G, H, I e J). Foram obtidos 149 isolados de *E. coli* do leite de tanques de expansão das propriedades supracitadas. As principais características de produção, rebanho bovino e instalações, assim como, de

manejo de ordenha de vacas das fazendasestudadas estão descritas nas tabelas 1 e2.

As amostras de leite foram coletadas em frascos estéreis e mantidas sob temperatura de refrigeração até o momento da realização dos exames microbiológicos no Núcleo de Pesquisas em Mastites (NUPEMAS), da FMVZ-UNESP, Botucatu-SP.

TABELA 1. Principais características de produção, rebanho bovino e instalações das fazendas estudadas. Botucatu, SP, 2020.

Características das fazendas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Animais/Raças	HPB	HPB	HPB	HPB	HPB	HPB	HPB	HPB	HPB	HPB
Nº de Vacas em lactação	820	203	325	230	510	419	620	423	382	300
Produção diária (L/dia)	27300	4900	11300	6900	14280	14246	19500	10000	14200	10000
Produção leiteira média L/animal/dia	33	24	34	30	28	34	31	23,2	37	30
Tipo de instalações	Free Stall	Free Stall	Free Stall	Compost barn	Free Stall	Free Stall	Cross ventilation	Compost barn	Cross ventilation	Compost barn
Higienedas instalações	Boa	Regular	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa
Higiene do equipamento de ordenha	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa
Sala de ordenha	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Tanque de resfriamento	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

HEB: Holandês preto e branco

TABELA 2. Principais características de manejo de ordenha de vacas em fazendas estudadas. Botucatu, SP, 2020.

Características das fazendas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Nº de ordenhas	3	3	3	3	3	3	2	2	3	2
Alimentação pós ordenha	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Tipo de secagem	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta
Ordenha mecânica	Duplo 24	Duplo 8	Duplo 8	Duplo 6	Duplo 12	Duplo 8	Duplo 20	Duplo 8	Carrossel	Duplo 6
Higiene equipamento	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa
Qualidade mão de obra	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa
Assistência veterinária	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não

4.3. Análise microbiológica

Foi realizada a homogeneização das amostras de leite provenientes dos tanques de expansão, incubação prévia do leite em caldo BHI (Brain Heart Infusion) na proporção de 1:10 durante 4horas a 37ºC, realização de diluições seriadas de 10^0 a 10^{-3} e semeadura de 0,1mL de cada diluição em placas demeio cromogênico, Chromocult® Agar para coliformes (Merck Millipore), incubando-se a 37ºC por 24horas.

Colônias compatíveis com *E. coli* foram identificadas por provas bioquímicas utilizando as provas de EPM, MILi e citrato de Simmons (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; ORDOÑEZ; MARTINEZ, 2005).

4.4. Teste de disco-difusão para avaliação da sensibilidade in vitro aos antimicrobianos e obtenção do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos – IRMA

O IRMA foi calculado pela razão entre o número de classe(s) de antimicrobiano(s) contra a(s) qual(ais) cada isolado é resistente e o número total de classes testadas (10 classes). Índices >0,3 foram considerados como fonte potencial de transmissão de genes de resistência (KRUMPERMAN, 1983). Todos os isolados foram submetidos ao teste padrão de difusão com discos (CLSI, 2014) diante de antimicrobianos de dez grupamentos indicados no tratamento/profilaxia de vacas com mastite - na lactação e período seco - por via intramamária e/ou parenteral (RIBEIRO, 2008): 1) cefalosporinas (ceftiofur - 30 mcg), 2) tetraciclinas (tetraciclina - 30mcg), 3) fluorquinolonas (enrofloxacino - 5mcg, marbofloxacino - 5mcg, ciprofloxacino - 5mcg), 4)aminoglicosídeos (gentamicina-10mcg, neomicina - 30mcg, estreptomicina - 10mcg), 5) penicilinas semi-sintéticas e aminopenicilinas (cloxacilina - 5mcg, ampicilina - 10mcg, amoxicilina - 10mcg), 6) sulfonamidas/trimetoprim (sulfametoxazole/trimetoprim - 25mcg), 7) anfenicóis (florfenicol - 30mcg), 8) macrolídeos (eritromicina - 15mcg), 9) lincosaminas (lincomicina - 2mcg) e 10) polipeptídeos (bacitracina - 10UI).

4.5. Teste de disco-difusão para investigação de *E. coli* produtora da enzima β-lactamase de espectro extendido(ESBL)

A investigação e interpretação deste método foi realizada de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014). Todos os isolados foram submetidos ao teste fenotípico de detecção de ESBL pelo método de aproximação de discos em ágar, utilizando amoxicilina/ácido clavulânico(30mcg) no centro, circundado por pelo menos quatro cefalosporinas de terceira geração: ceftriaxona (30mcg), ceftazidima (30mcg), cefpodoxima (10mcg), cefotaxima (30mcg), cefoperazona (30mcg) e/ou aztreonam(30mcg). As placas foram incubadas por 16- 18 horas, em aerobiose a 37ºC, e a leitura realizada conforme recomendação do CLSI (CLSI, 2014). Isolados com aumento do diâmetro do halo de inibição ou distorção do halo ao redor dos fármacos beta-lactâmicos (“zona fantasma”) foram considerados como ESBL-positivos (CLSI, 2014). Isolados ESBL-positivos ou com IRMA >0,3 foram triados para o diagnóstico molecular de genes deresistência.

4.6. Verificação e quantificação da produção de biofilme em plástico de poliestireno, inox esilicone.

Foi testada a produção de biofilme em placas de poliestireno (mais utilizado nos artigos publicados, para comparação), além de aço inoxidável e silicone, materiais com os quais as bactérias entram em contato, durante aordenha e durante o processo industrial.

4.6.1. Preparo da cultura e inoculação naplaca

As cepas de *E.coli* foram incubadas em caldo de Luria Bertani (LB) e incubadas a 35ºC/24h. A seguir, a cultura foi diluída até 10^8 UFC de bactérias, com o auxílio de turbidímetro. Alíquotas de 200 µL (placa de poliestireno, de 96 poços) ou de 300 µL (placas com 24 poços, para testes de produção em aço inox e silicone) dessa diluição foram distribuídas nos poços de cada placa.

4.6.2. Biofilme em plástico depoliestireno

A partir da diluição 10^8 UFC, uma alíquota de 200 µl foi depositada, em triplicata, em microplaca de 96 poços, com fundo chato, incubadas a 35ºC/48h (OOSTERIK et al., 2014). Após período de incubação, a placa foi lavada três vezes, com solução salina tamponada (PBS, pH 7,4), seca à temperatura ambiente e corada com cristal violeta a 1%, por 15 minutos. Após três lavagens com água destilada, a placa, foi submetida à secagem em temperatura ambiente e 200 µl de álcool acético glacial foi adicionado aos poços, para desprendimento e homogeneização do biofilme. Após 15 minutos, ocorreu a leitura da placa em um leitor de ELISA (Babsystems, MultiSkan EX), 540 nm. TSB não inoculado foiutilizado para corrigir o valor da absorbância e foi calculada a média dos três poços (VASUDEVAN et al., 2003).

4.6.3. Biofilme em açoinox

Foram utilizados círculos (fichas), com diâmetro de 1 cm de aço inox 304 (figura 1). Esses materiais foram devidamente lavados, secos e autoclavados. Posteriormente, com o auxílio de uma pinça esterilizada, cada ficha foi depositada no fundo de um poço de uma placa de 24 poços, estéril e comtampa.

A partir da diluição 10^8 UFC, uma alíquota de 300 µl foi colocada, em triplicata, nessa placa e incubada a 35ºC/48h (OOSTERIK et al., 2014).

A seguir, as fichas foram transferidas para uma nova placa. Essa operação tem como objetivo evitar a quantificação de biofilme eventualmente produzido no plástico, ao redor das fichas de diferentes materiais. Uma vez na placa nova, as fichas foram lavadas três vezes, com solução tampão (PBS, pH 7,4), para a remoção das células não fixadas e coradas com cristal violeta 1%, por 15 minutos. O corante foi removido e a placa, novamente lavada. A seguir, o biofilme foi ressuspendido em 300 µl de ácido acético glacial, por 15 minutos, que assegura a homogeneidade do material corado. Um volume de 200 µl foi transferido para uma microplaca de 96 poços, lida em um leitor de espectofotometria em 540 nm.

As cepas testadas foram classificadas em níveis de produção de biofilme (STEPANOVIC et al., 2007). A partir da média das três repetições (D.O.) e de acordo com a relação entre D.O. e D.O.c (controle negativo), as amostras foram classificadas em não produtoras, fracas, moderadas ou fortes produtoras de biofilme.

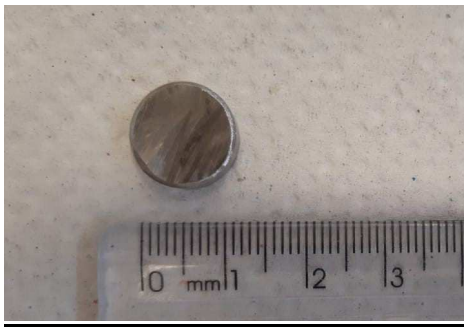

FIGURA 1. Ficha de aço inox utilizada naverificação da produção de biofilme em inox. NUPEMAS, FMVZ, UNESP, 2020.

4.6.4. Biofilme em silicone

Foram utilizadas fichas de silicone (Figura 2) devidamente lavadas, secas e autoclavadas. Posteriormente, com o auxílio de uma pinça esterilizada, cada ficha foi depositada no fundo de um poço de uma placa de 24 poços, estéril e com tampa.

O restante do procedimento foi realizado de forma idêntica ao aço inox previamente descrito.

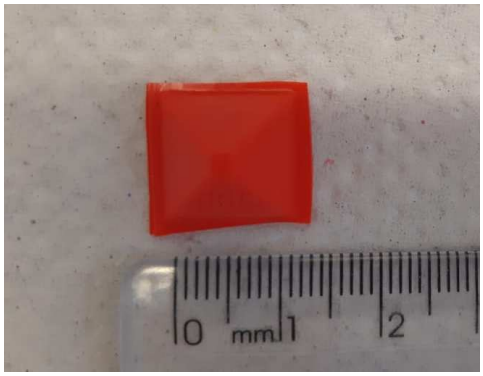

FIGURA 2. Ficha de silicone utilizada na verificação da produção de biofilme em inox. NUPEMAS, FMVZ, UNESP, 2020.

4.7. Teste de sensibilidade a desinfetante na presença de biofilme

As cepas produtoras de biofilme foram submetidas ao teste de

susceptibilidade aos desinfetantes iodo e digluconato de clorexidina. Para a realização do teste, foi determinada a Concentração Bactericida Mínima (CBM) em três horas de incubação em caldo Luria Bertani (LB).

O inóculo bacteriano foi preparado em caldo Luria Bertani em uma concentração de, aproximadamente, 10^8 UFC/mL. Para o teste, foi utilizada microplaca de 96 poços estéril. No primeiro poço foi adicionado um volume de 200 µL do desinfetante na concentração de 2%. A partir do poço inicial, diluições seriadas de base 2 foram realizadas e alíquotas de 100 µL da suspensão bacteriana foram adicionadas em cada poço, obtendo-se diluições decrescentes de 1% a 0,5%. A microplaca foi levemente agitada e incubada à 35ºC/3h. Para obtenção da CBM, uma alçada do conteúdo de cada poço foi plaqueada em Ágar TSA e as placas foram incubadas a 35ºC/24h. O valor da CBM foi considerado como a menor diluição do desinfetante capaz de inibir totalmente o crescimento na placa.

Após a determinação da CBM, foi realizada a produção de biofilme em microplaca de 96 poços por 72 horas, para a formação de um biofilme maduro. Após esse período, os poços foram lavados quatro vezes com PBS estéril e em cada um foi inoculado 200 µL do desinfetante e a placa foi incubada a 35ºC/3h. Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi plaqueado em placas contendo TSA, para confirmar a eficiência do antimicrobiano, pela ausência de crescimento. Como controle, um poço foi inoculado com LB no substituindo o isolado bacteriano.

4.8. Realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dosisolados

Uma colônia reisolada em placa com meio de ágar Luria-Bertani (LB) foi transferida para um tubo de microcentrífuga contendo 200µL de água Milli-Q estéril e submetida à fervura por 10 minutos. A seguir, foi resfriada em banho de gelo.Para cada reação foram utilizados 1 µL do DNA molde, 2,5 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 1,5 mM de cloreto de magnésio, tampão de PCR 1X e 0,2 mM da mistura de dNTPs (Invitrogen). Foram utilizadas cepas previamente conhecidas (ATCC ou amostras de campo sequenciadas) como controle positivo e negativo, além de água ultra-pura como branco. Após a amplificação dos

fragmentos, os produtos foram obtidos por eletroforese em gel de agarose a1,5%. A sequência dos iniciadores empregadas no desenvolvimento deste estudo estão descritas nos quadros 1, 2 , 3 e 4.

QUADRO 1. Genes de produção de biofilme e sequências dos iniciadores empregados nas reações dePCR.

Genes	Direção	Sequência do oligonucleotídeo (5' - 3')	Referência
*fim*A	Forward	AGTTAGGACAGGTTCGTACCGCAT	(HERNANDES et al., 2011)
	Reverse	AAATAACGCGCCTGGAACGGAATG	
*fim*E	Forward	AAACGTCGTTATCTTACCGG	(HERNANDES et al., 2011)
	Reverse	TTTCTTTCCCATAATCCGGC	
*ecp*RAB	Forward	AACAGCAATATTAGGGGCGTG	(AVELINO et al., 2010)
	Reverse	GGATAACAGCAGAGCGAGAAG	
*ecp*A	Forward	GCAACAGCCAAAAAAGACACC	(HERNANDES et al., 2011)
	Reverse	CCAGGTCGCGTCGAACT	
*csg*D	Forward	CGCGAATTCTCGCTGGCAATTACAGG	(SALDAÑA et al., 2009)
	Reverse	CGCGGATCCGCTGATGAACAACGAAC	
*elf*A	Forward	ACGATGAAAAAAAGTGTATTGACGG	(HERNANDES et al., 2011)
	Reverse	CCGCATTCACATTACCAGAA	
*hcp*A	Forward	TCGCTAGTTGCTGACAGATTT	(XICOHTENCATL-CORTES et al., 2007)
	Reverse	AATGTCTGTTGTGTGCGACTG	

QUADRO 2. Sequência dos oligonucleotídeos empregados para detecção dos genes de produção deESBLs.

Gene	Direção	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')	Referência
bla_{tem}	forward	CATTTTCGTGTCGCCCTTATTC	(NÓBREGA et al., 2013)
	reverse	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
$bla_{ctx\text{-}m}$	forward	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	
	reverse	TGGGTRAARTARGTSACCAGA	

blashv	forward	ATGCGTTATATTCGCCTGTGTA	
	reverse	TTAGCGTTGCCAGTGCTCGATCAG	

QUADRO 3. Genes de virulência e sequências dos iniciadores usados na pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* extraintestinal (ExPEC).

Genes de virulência	Sequência dos iniciadores (5' → 3')	Referência
Adesinas		
sfaDE[a]	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	(LE BOUGUENEC; ARCHAMBAUD; LABIGNE, 1992)
fimH	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	(TENNANT et al., 2009)
iha	CAGTTCAGTTTCGCATTCACC GTATGGCTCTGATGCGATG	(SCALETSKY et al., 2009)
papA[a]	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	(JOHNSON; STELL, 2000)
papC[a]	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	(LE BOUGUENEC; ARCHAMBAUD; LABIGNE, 1992)
afaBC[a]	GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	(LE BOUGUENEC; ARCHAMBAUD; LABIGNE, 1992)
Toxinas		
hlyA	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	(YAMAMOTO et al., 1995)
sat	TGCTGGCTCTGGAGGAAC TTGAACATTCAGAGTACCGGG	(EWERS et al., 2007)
vat	TCCTGGGACATAATGGCTGA GTGTCAGAACGGAATTGTC	(EWERS et al., 2004)
ehxA	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG TCTCGCCTGATAGTGTTTGGTA	(SCHMIDT; BEUTIN; KARCH, 1995)
cnf	TTATATAGTCGTCAAGATGGA CACTAAGCTTTACAATATTGA	(TÓTH et al., 2003)
cdt	GAAARTAAATGGAAYAYAMATGTCCG AATCWCCWRSAATCATCCAGTTA	(TENNANT et al., 2009)
Sideróforos		
iroN	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG GACGCCGACATTAAGACGCAG	(JOHNSON et al., 2000a)
irp2	AAGGATTCGCTGTTACCGGAC TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	(CZECZULIN et al., 1999)
iucD[a]	AAGTGTCGATTTTATTGGTGTA CCATCCGATGTCAGTTTTCTG	(HERRERO; DE LORENZO; NEILANDS, 1988)
ireA	ATTGCCGTGATGTGTTCTGC CACGGATCACTTCAATGCGT	(EWERS et al., 2007)
sitA	AGGGGGCACAACTGATTCTCG TACCGGGCCGTTTTCTGTGC	(RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005)
Outros: Invasinas (*ibe* e *ompT*), e mecanismos de resistência ao soro (*traT*)		
Ibe	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC	(HUANG et al., 1995)

ompT	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	(JOHNSON et al., 2000b)
traT	CCCGGGTCATAGTGTTCATC GGTGTGGTGCGATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	(JOHNSON; STELL, 2000)
kpsMT II[a]	GCGCATTTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	(JOHNSON et al., 2000a)

[a]Marcadores de virulência empregados na definição molecular de ExPEC (JOHNSON, 2003).

QUADRO 4. Genes de virulência e sequências dos iniciadores empregados nas reações de PCR para a pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* diarreiogênicas.

Genes	Sequência dos iniciadores (5' → 3')	Referência
bfpA	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	(ARANDA et al., 2007)
stx1	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	(PATON; PATON, 1998)
stx2	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	(PATON; PATON, 1998)
est	ATTTTTMTTTCTGTATTRTCTT CACCCGGTACARGCAGGATT	(ARANDA et al., 2007)
ipaH	GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	(TOMA et al., 2003)
aggR	GTATACACAAAAGAAGGAAGC ACAGAATCGTCAGCATCAGC	(TOMA et al., 2003)
aatA	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	(SCHMIDT et al., 1995)

4.9. Análise estatística

Inicialmente foram produzidas distribuições de frequências para descrição da proporção de resistência aos diferentes antimicrobianos, prevalência dos genes estudados e prevalência de cepas formadoras de biofilmes nos materias utilizados. Modelos de regressão logística (PROC LOGISTIC, SAS Institute, Cary, NC) foram utilizados para estimar as chances de formação de biofilme entre os materiais estudados. Para cada material estudado, os testes de Qui-quadrado ou de Fisher (PROC FREQ, SAS Institute) foram utilizados para comparar a proporção de formação de biofilme entre os isolados positivos e negativos para cada gene pesquisado. Todas as análises foram realizadas em nível de significância de 0,05.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Teste de disco-difusão para avaliação da sensibilidade in vitro aos antimicrobianos e obtenção do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos – IRMA

Foi realizado o teste de disco-difusão para avaliação da sensibilidade in vitro aos antimicrobianos para obtenção do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) de todos os isolados obtidos até o momento, em que foi possível observar índice >0,3 em 36 (24,2%) dos 149 isolados analisados.

A frequência de sensibilidade para cada antimicrobiano e classes utilizados está disponível na tabela 3.

TABELA 3. Perfil de sensibilidade *in vitro* (método de difusão em discos) em *E. coli* isolados de tanques de expansão. Botucatu,2020.

Antimicrobiano	Classe	Sensíveis % (N)	Parcialmente sensíveis % (N)	Resistentes % (N)
Estreptomicina 10 mcg	Aminoglicosídeo	76,51 (114/149)	22,82 (34/149)	0,67 (1/149)
Gentamicina 10 mcg		99,33 (148/149)	0,67 /1/149)	0 (0/149)
Neomicina 30 mcg		64,43 (96/149)	35,57 (53/149)	0 (0/149)
Ampicilina 10 mcg	Penicilinas semi-sintéticas e amino penicilinas	85,91 (128/149)	0,74 (16/149)	3,36 (5/149)
Amoxicilina 10 mcg		78,52 (117/149)	19,46 (29/149)	2,01 (3/149)
Cloxacilina 5 mcg		0 (0/149)	0 (0/149)	100 (149/149)
Florfenicol 30 mcg	Anfenicóis	99,33 (148/149)	0,67 (1/149)	0 (0/149)
Ceftiofur 30 mcg	Cefalosporinas	99,33 (148/149)	0,67 (1/149)	0 (0/149)
Ciprofloxacino 5 mcg	Fluorquinolonas	100 (149/149)	0 (0/149)	0 (0/149)
Enrofloxacino 5 mcg		97,32 (145/149)	2,68 (4/149)	0 (0/149)
Marbofloxacino 5 mcg		100 (149/149)	0 (0/149)	0 (0/149)
Lincomicina 2 mcg	Lincosaminas	0 (0/149)	0 (0/149)	100 (149/149)
Bacitracina 10 UI	Polipeptídeo	0 (0/149)	0 (0/149)	100 (149/149)
Sulfametoxazol / trimetoprim 25mcg	Sulfoamidas	95,97 (143/149)	0,67 (1/149)	3,36 (5/149)
Tetraciclina 30 mcg	Tetraciclinas	93,26 (139/149)	0,67 (1/149)	6,04 (9/149)

Eritromicina 15 mcg	Macrolídeos	16,11 (24/149)	65,10 (97/149)	18,79 (28/149)

5.2. Teste de disco-difusão para investigação de *E.coli* produtora da enzima β- lactamase de espectro extendido (ESBL)

Dos 149 isolados de *E. coli* avaliados, nenhum apresentou característica fenotípica de produtor da enzima β-lactamase de espectro extendido (ESBL) pelo teste de difusão em disco.

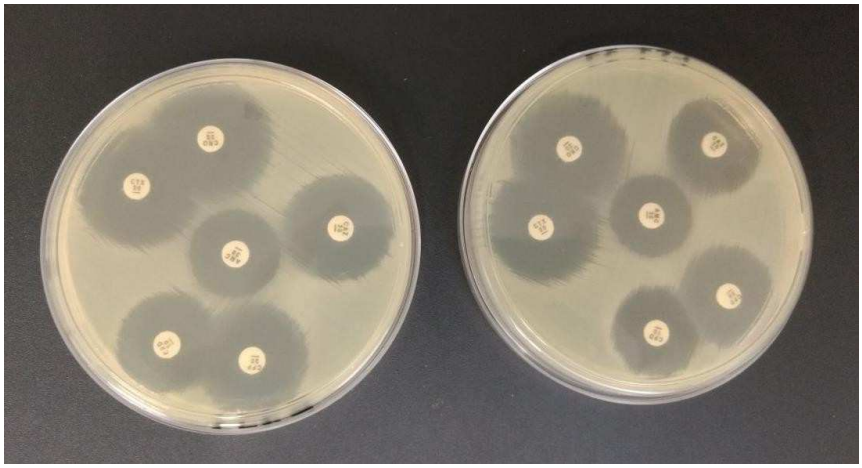

FIGURA 3. Pesquisa fenotípica de ESBL pelo teste de disco-difusão. NUPEMAS, FMVZ, UNESP, 2020.

5.3. Verificação e quantificação da produção de biofilme em plástico de poliestireno,inox e silicone.

Os resultados referentes à produção de biofilme nas diferentes superfícies (materiais) utilizados, encontram-se na tabela 4.

TABELA 4. Prevalência da produção de biofilme em poliestireno, inox e silicone a partir de isolados de *E. coli* obtidos de amostras de leite de tanques de expansão. Botucatu, 2020.

	Produção de biofilme % (N)	RC[1]	IC 95%[2]	Valor-P
Material				< 0,001
Poliestireno	42,28 (63/149)	2,68	1,61-4,46	
Silicone	56,38 (84/149)	4,72	2,84-7,87	
Inox	21,48 (32/149)	Referência		

[1]Razão de chances derivada de modelos lineares generalizados (regressão logística).

[2] Intervalo de confiança a 95% para a razão de chances.

5.4. Teste de sensibilidade a desinfetante na presença de biofilme

Foram realizados testes para determinação da CBM a fim de avaliar a susceptibilidade dos isolados formadores de biofilme em poliestireno aos desinfetantes iodo e digluconato de clorexidina.

Foram submetidas aos testes as 63 amostrasprodutoras de biofilme na superfície de poliestireno. Dentre essas, não houve formação de biofilme quando ambos os desinfetantes foram adicionados juntamente com o inóculo bacteriano e submetidos a incubação por 3 horas. Porém, ao avaliar-se a formação de biofilme maduro (72 horas de incubação) e após essa, a adição dos desinfetantes e incubação por 3 horas, 25,40%(16/63) isolados obtiveram crescimento no meio TSA para pelo menos um dos agentes testados, cujos resultados apresentam-se na tabela 5.

TABELA 5. Sensibilidade dos isolados de *E. coli* formadores de biofilme em poliestireno a iodo e digluconato de clorexidina após a indução de formação do biofilme com 72h de incubação. FMVZ UNESP, Botucatu, 2020.

Amostra	Percentual de desinfetante	
	Iodo	**Digluconato de clorexidine**
1	Sensível	2
4	0,25	0,5
6	Sensível	1
9	0,25	Sensível
11	0,25	Sensível

12	0,25	0,50
13	0,25	0,25
17	0,50	0,50
25	0,25	0,50
27	Sensível	0,25
45	0,50	0,50
70	0,25	Sensível
71	0,25	Sensível
73	Sensível	0,50
74	0,25	Sensível
81	0,25	0,50

5.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos isolados

Foram realizadas reações em cadeia da polimerase dos isolados de *E. coli* obtidos no projeto, cujos resultados apresentam-se nas tabelas 6, 7 e 8 abaixo:

TABELA 6. Reação em cadeia da polimerase de isolados de *E. coli* oriundos de leite bovino de tanque de expansão para detecção de genes relacionados à produção de biofilme e produção de ESBLs. FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020.

Genes relacionados à produção de biofilme	
Genes	**Percentual (Positivos/total)**
fimA	100% (149/149)
fimE	99,3% (148/149)
ecpRAB	34,2% (51/149)
ecpA	91,3% (136/149)
csgD	96,0% (143/149)
elfA	100% (149/149)
*hcp*A	6,7% (10/149)
Genes relacionados à produção de ESBLs	
Genes	**Percentual (Positivos/total)**

bla$_{tem}$	0%(0/149)
bla$_{ctx-m}$	0%(0/149)
bla$_{shv}$	0%(0/149)

TABELA 7. Reação em cadeia da polimerase de isolados de *E. coli* oriundos de leite bovino de tanque de expansão para detecção de genes relacionados à pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* extraintestinal (ExPEC). FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020.

Genes	Percentual (Positivos/total)
Adesinas	
sfaDE[a]	0%(0/149)
fimH	100% (149/149)
iha	0%(0/149)
papA[a]	0%(0/149)
papC[a]	0%(0/149)
afaBC[a]	0%(0/149)
Toxinas	
hlyA	5,4%(8/149)
sat	0%(0/149)
vat	0%(0/149)
ehxA	0%(0/149)
cnf	0%(0/149)
cdt	0%(0/149)
Sideróforos	
iroN	0%(0/149)
irp2	2,7%(4/149)
iucD[a]	0%(0/149)
ireA	0%(0/149)
sitA	10,7%(16/149)
Outros: Invasinas (*ibe*), e mecanismos de resistência ao soro (*ompT*, *traT*e *kpsMTII*)	
ibe	0%(0/149)
ompT	43,6%(65/149)
traT	98,0%(146/149)
kpsMT II[a]	0%(0/149)

TABELA 8. Reação em cadeia da polimerase de isolados de *E. coli* oriundos de leite bovino de tanque de expansão para detecção de genes relacionados à pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* diarreiogênicas.FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020.

Genes	Percentual (Positivos/total)
bfpA	0%(0/149)
stx1	0%(0/149)
stx2	0%(0/149)
est	0%(0/149)
ipaH	0%(0/149)
aggR	0%(0/149)
aatA	0%(0/149)

A tabela 9 apresenta os dados de associação entre os genes relacionados com a produção de biofilme *in vitro* em poliestireno, inox e silicone.

TABELA 9. Associação dos genes relacionados com a produção de biofilme com a produção *in vitro* de biofilme em poliestireno, inox e silicone de isolados de *E. coli* obtidos de leite de tanques de expansão. FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020.

Material	**Poliestireno**		**Inox**		**Silicone**	
Genes	Produção de biofilme %(N)	Valor-P	Produção de biofilme %(N)	Valor-P	Produção de biofilme %(N)	Valor-P
fimA		N/A		N/A		N/A
Positivo	42,28 (63/149)		21,48 (32/149)		56,38 (84/149)	
Negativo	0,00 (0/0)		0,00 (0/0)		0,00 (0/0)	
fimE		1,00		1,00		1,00
Positivo	42,57 (63/148)		21,62 (32/148)		56,08 (83/148)	
Negativo	0,00 (0/1)		0,00 (0/1)		100,00 (1/1)	
ecpRAB		<0,0001		0,0035		0,0116
Positivo	17,57 (9/51)		7,84 (4/51)		70,59 (36/51)	
Negativo	55,10 (54/98)		28,57 (28/98)		48,98 (48/98)	
ecpA		0,0399		<0,0001		0,8473
Positivo	44,85 (61/136)		15,44 (21/136)		56,62 (77/136)	
Negativo	15,38 (2/13)		84,62 (11/13)		53,85 (7/13)	
csgD		0,6978		0,3414		1,00

Positivo	41,96 (60/143)		22,38 (32/143)		56,64 (81/143)	
Negativo	50,00 (3/6)		0,00 (0/6)		50,00 (3/6)	
elfA		N/A		N/A		N/A
Positivo	42,28 (63/149)		21,48 (32/149)		56,38 (84/149)	
Negativo	0,00 (0/0)		0,00 (0/0)		0,00 (0/0)	
hcpA		0,0182		0,1196		0,1040
Positivo	80,00 (8/10)		0,00 (0/10)		30,00 (3/10)	
Negativo	39,57 (55/139)		23,02 (32/139)		58,27 (81/139)	

Já a tabela 10 apresenta os dados de associação entre os genes relacionados com os fatores de virulência de *E. coli* extra-intestinal com a produção *in vitro* em poliestireno, inox e silicone.

TABELA 10. Associação dos genes relacionados com a produção de fatores de virulência em *E. coli* extra-intestinais (ExPEC) com a produção *in vitro* de biofilme em poliestireno, inox e silicone de isolados obtidos de leite de tanques de expansão. FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020.

Material	**Poliestireno**		**Inox**		**Silicone**	
Genes	Produção de biofilme %(N)	Valor-P	Produção de biofilme %(N)	Valor-P	Produção de biofilme %(N)	Valor-P
sfaDE		N/A		N/A		N/A
Positivo	0,00 (0/0)		0,00 (0/0)		0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)		21,48 (32/149)		56,38 (84/149)	
fimH		N/A		N/A		N/A
Positivo	42,28 (63/149)		21,48 (32/149)		56,38 (84/149)	
Negativo	0,00 (0/0)		0,00 (0/0)		0,00 (0/0)	
iha		N/A		N/A		N/A
Positivo	0,00 (0/0)		0,00 (0/0)		0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)		21,48 (32/149)		56,38 (84/149)	
papA		N/A		N/A		N/A
Positivo	0,00 (0/0)		0,00 (0/0)		0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)		21,48 (32/149)		56,38 (84/149)	
papC		N/A		N/A		N/A
Positivo	0,00 (0/0)		0,00 (0/0)		0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)		21,48 (32/149)		56,38 (84/149)	

afaBC		N/A	N/A	N/A
Positivo	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)	21,48 (32/149)	56,38 (84/149)	
hlyA		0,2835	0,2024	0,0010
Positivo	62,50 (5/8)	0,00 (0/8)	0,00 (0/8)	
Negativo	41,13 (58/141)	22,70 (32/141)	59,57 (84/141)	
sat		N/A	N/A	N/A
Positivo	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)	21,48 (32/149)	56,38 (84/149)	
vat		N/A	N/A	N/A
Positivo	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)	21,48 (32/149)	56,38 (84/149)	
ehxa		N/A	N/A	N/A
Positivo	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)	21,48 (32/149)	56,38 (84/149)	
cnf		N/A	N/A	N/A
Positivo	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)	21,48 (32/149)	56,38 (84/149)	
cdt		N/A	N/A	N/A
Positivo	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)	21,48 (32/149)	56,38 (84/149)	
iroN		N/A	N/A	N/A
Positivo	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)	21,48 (32/149)	56,38 (84/149)	
irp2		0,1379	1,00	1,00
Positivo	0,00 (0/4)	25,00 (1/4)	50,00 (2/4)	
Negativo	43,35 (63/145)	21,38 (31/145)	56,55 (82/145)	
iucD		N/A	N/A	N/A
Positivo	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)	21,48 (32/149)	56,38 (84/149)	
ireA		N/A	N/A	N/A
Positivo	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)	21,48 (32/149)	56,38 (84/149)	
sitA		0,005	0,0236	0,0002
Positivo	75,00 (12/16)	0, 00(0/16)	12,50 (2/16)	
Negativo	38,35 (51/133)	24,06 (32/133)	61,65 (82/133)	
ibe		N/A	N/A	N/A

Positivo	0,00 (0/0)		0,00 (0/0)		0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)		21,48 (32/149)		56,38 (84/149)	
ompT		0,0651		0,4305		0,0006
Positivo	50,77 (33/65)		18,46 (12/65)		72,31 (47/65)	
Negativo	35,71 (30/84)		23,81 (20/84)		44,05 (37/84)	
traT		0,2629		0,0092		0,2572
Positivo	43,15 (63/146)		19,86 (29/146)		55,48 (81/146)	
Negativo	0,00 (0/3)		100,00 (3/3)		100,00 (3/3)	
kpsMTII		N/A		N/A		N/A
Positivo	0,00 (0/0)		0,00 (0/0)		0,00 (0/0)	
Negativo	42,28 (63/149)		21,48 (32/149)		56,38 (84/149)	

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1. Qualidade do leite

O leite de tanques de expansão pode conter micro-organismos patogênicos (JAYARAO et al., 2006; JAYARAO; HENNING, 2001; STRALEY et al., 2006; VAN KESSEL et al., 2004) os quais podem ser provenientes de diferentes origens, tais como, os animais da propriedade devido aos casos de mastite, equipamentos de ordenha ou tanque de refrigeração do leite contaminado e, no caso, por se tratar de um estudo em que objetivou-se o isolamento de *E. coli*, é necessário considerar o ambiente de exploração leiteira como um todo (LEJEUNE et al., 2004).

Em virtude da ampla possibilidade de origem dos micro-organismos isolados a partir de leite oriundos de tanques de expansão, destaca-se o grau de tecnificação das propriedades leiteiras, sendo que o número de isolados tende a ser minimizado proporcionalmente ao grau de tecnificação empregado, como é o caso do objeto deste estudo, em que foram utilizadas propriedades leiteiras com alto grau de tecnificação, dificultando inclusive a obtenção de isolados de *E. coli.* Em propriedades mais tecnificadas, que contam com assistência de profissionais especializados, dificilmente o leite oriundo de casos de mastites clínicas são erroneamente destinados aos tanques de expansão e os casos de mastite subclínica também são diagnosticados mais precocemente, além desses aspectos a limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha e do próprio tanque são realizados de maneira adequada e dentro da periodicidade estabelecida, minimizando a contaminação do leite dos tanques (LANGONI, 2013).

Nos últimos anos foi possível observar um aumento no consumo de leite cru, justificado pelos consumidores pela qualidade e sabor do produto, muito embora não tenham estudos que comprovem essa diferença organoléptica (OLIVER et al., 2009). Porém, é possível afirmar que leite ou derivados lácteos que não tenham passado por tratamento térmico e que sejam oriundos de fontes com ausência de órgãos oficiais reguladores, além de albergar patógenos responsáveis por causar doença em humanos, também podem ter sido objeto de fraudes que levam a alterações na composição do produto (RAYMUNDO; BERSOT; OSAKI, 2018).

No Brasil, o comércio de leite cru foi proibido em 1969, por meio da publicação do Decreto-lei 923 (BRASIL, 1969), o qual foi regulamentado pelo

Decreto 66.183 em 1970 (BRASIL, 1970). Apesar das legislações publicadas, estudos relatam que uma parcela significativa do leite comercializado seja proveniente do mercado informal (NERO; MAZIERO; BEZERRA, 2003; RAYMUNDO; BERSOT; OSAKI, 2018).

Embora as propriedades utilizadas neste estudo destinem a produção para laticínios, os trabalhadores de cada uma delas utiizam o leite para consumo próprio.Dessa forma, não há como garantir que eles estabeleçam um processo térmico adequado do leite consumido. Outros estudos demonstram que parte dos consumidores de leite cru não possuem conhecimento que podem adquirir enfermidades por meio deste veículo (JAYARAO et al., 2006; LEJEUNE et al., 2004). Por essa razão, o consumo do leite cru associado ao desconhecimento de seus consumidores da possibilidade de transmissão de doenças pode ser um sério problema de saúde pública.

6.2. Resistência aos antimicrobianos

O uso inadequado de antimicrobianos pode ser devido a diversos fatores, sejam eles, desde a ausência de registro da sua utilização para fins de controle até mesmo devido a falta da presença do médico veterinário para o tratamento de animais doentes. Esse uso indiscriminado pode levar ao aumento da pressão seletiva para micro-organismos resistentes (STRALEY et al., 2006). Fato que corrobora com o índice de resistência múltipla a antimicrobianos encontrado neste estudo(24,16%).

Na bovinocultura de leite, destacam-se a terapia da vaca seca e o tratamento de mastites como motivação para o uso de antimicrobianos. Nos casos de infecção da glândula mamária, a qual corresponde à maioria dos casos de mastite, recomenda-se maior critério no tratamento dos animais devido a possibilidade de cura espontânea e casos de cultivo negativo (LANGONI et al., 2017).

Uma das alternativas para o uso de antimicrobianos é a administração baseada no cultivo de amostras de leite mastítico na propriedade, que obtem rápido resultado dos casos e evita o uso desnecessário desses medicamentos, respaldando o tratamento somente em quartos positivos e com possibilidade de cura (CAMERON et al., 2015).

Uma significativa parcela de infecções alimentares ocorre devido a ingestão

de micro-organismos resistentes a inúmeros antimicrobianos, os quais tem como origem os animais produtores de alimentos, levando a impactosna saúde pública. (TOLLEFSON; FLYNN, 2002).

A transmissão de genes de resistência a antimicrobianos em bactérias pode ocorrer de inúmeras formas, tanto por meio de herança para as células filhas, quando esses são localizados em cromossomos, ou pode ocorrer de forma horizontal, por meio da transmissão de elementos genéticos móveis como é o caso dos plasmídeos e transposons (TOLLEFSON; FLYNN, 2002).

Embora o IRMA encontrado no estudo revele uma situação preocupante e a frequência de isolados resistentes às penicilinas também seja digna de nota, não foi encontrada nenhuma amostra com características fenotípicas de resistência *in vitro* de ESBL e nem a presença de genes para seus principais tipos. O que nos leva a afirmar que tanto no espaço tanto físico das propriedades estudadas como no espaço de tempo em que foi decorrido o estudo, esse não é um problema. Porém esse fato, não elimina a possibilidade de tornar-se uma realidade futura, já que as ESBLs decorrem de mutações simples a partir de β-lactamases comuns (PFALLER; SEGRETI, 2006). Dessa forma, ações de educação sanitária no que se refere a utilização de antimicrobianos deve ser sempre enfatizada nas propriedades rurais.

6.3. Biofilmes

Apesar dos problemas significativos causados pelos biofilmes na indústria de alimentos, a formação de biofilmes nesses ambientes ainda é pouco compreendida e o controle eficaz dos biofilmes continua sendo um desafio (CAPPITELLI; POLO; VILLA, 2014). A formação de biofilme depende de uma série de diferentes fatores, dentre eles, destacam-se a capacidade dos micro-organismos que o compõe em aderir a superfície e desenvolver as etapas de formação do biofilme maduro, natureza da superfície de fixação e pelos fatores ambientais presentes, como temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes no meio (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010).

São diversas as propriedades da superfície, seja ela biótica ou abiótica, que interferem diretamente na formação do biofilme, como a rugosidade do material, a hidrofobicidade, vulnerabilidade ao desgaste e, no caso de superfícies abióticas, a

capacidade desse material ser submetido aos processos de limpeza e desinfecção adequada (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010).

Em ambientes de processamento de alimentos, nesse caso enquadram-se tanto o local e equipamentos de obtenção leiteira como também os laticínios, a fixação bacteriana é afetada pelos constituintes da matriz alimentar. A exposição das superfícies ao contato prolongado com os alimentos pode levar a fixação de micro-organismos inclusive em superfícies adequadas e amplamente utilizadas no âmbito industrial, como é o caso do aço inoxidável (SOMERS; LEE WONG, 2004).

As falhas de higienização de equipamentos permitem que o acúmulo de micro-organismos em superfícies leve a formação de biofilmes tanto no ambiente da propriedade leiteira como na indústria de laticínios. A formação de biofilme em diferentes materiais, como verificado neste estudo levam a preocupantes indagações quanto a recontaminação do leite na indústria, a qual pode levardesde a deterioração do produto e diminuição da sua vida de prateleira (KASNOWSKI et al., 2010), como também, sérios riscos no âmbito da saúdepública, devido a possibilidade de transmissão de doenças.

Os materiais utilizados foram escolhidos devido a possibilidade de comparação com outros estudos *in vitro* para a produção e quantificação de biofilmes (poliestireno), como a fim de mimetizar os materiais utilizados nos equipamentos de ordenha (inox e silicone) e na indústria láctea (inox). Por essa razão dentre as possibilidades de escolha de inox, foi utilizado inox 304, o qual, juntamente com o 316, são os de graus austeníticos mais amplamente presentes para fins industriais, devido a causa física/mecânica, estabilidade térmica a diferentes temperaturas de processamento de alimentos, capacidade de limpeza e alta resistência à corrosão (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Dentre os resultados obtidos, foi possível observar a formação de biofilme em 42,28% dos isolados em poliestireno, 56,38% em silicone e 21,48% em inox. Ainda foi realizada a comparação dos três materiais em que a chance do biofilme ser formado em poliestireno é 2,68 vezes maior do que o inox e o silicone 4,72 vezes. Já era esperado que o inox fosse o material com menor formação de biofilme em sua superfície, devido às características da mesma(ZOTTOLA; SASAHARA, 1994), as quais fundamentam a escolha desse material para uso

industrial.

Embora tenha sido escolhido o poliestireno o material para comparação com demais estudos de formação de biofilme a partir de isolados de *E. coli*, as publicações com essa temática ainda são escassas quando trata-se de amostras provenientes de leite, o que em parte motivou a realização do presente estudo, considerando os aspectos negativos da formação de biofilme tanto para a indústria de laticínios, como para a saúde pública.

Milanov et al. (2015) desenvolveram um estudo com 25 isolados de *E. coli* provenientes de casos de mastite bovina. Nesse trabalho eles averiguaram a produção de biofilme tanto no meio LB como também no caldo de triptona soja (TSB) em duas diferentes temperaturas: 20ºC e 37ºC. Sendo que foi verificada a produção de biofilme em 64% a 20ºC e 56% em 37ºC no meio LB e em 68% a 20ºC e 24% em 37ºC no meio TSB.

Algumas outras espécies e gêneros de micro-organismos também foram descritos como formadores de biofilme em amostras de leite ou do ambiente leiteiro. Um outro estudo realizado também com amostras de leite mastítico, leite de tanques de expansão, equipamentos de ordenha e mãos de ordenhadores provenientes do Brasil revelou a formação de biofilme por*Staphylococcus aureus* em poliestireno, inox e borracha em 45,2%, 41,9% e 38,7%, porém nenhuma das 849 amostras avaliadas foi formadora de biofilme em silicone (LEE et al., 2014).

O aço inoxidável foi utilizado neste estudo para poder mimetizar os equipamentos de ordenha, os quais são constituídos basicamente desse material, o próprio tanque de expansão leiteiro e também os equipamentos do laticínio. A sobrevivência de *E. coli* sob condições de estresse e a habilidade de formação de biofilme depende do sorotipo de cada isolado e de suas características. Cepas patogênicas apresentam maiores resistências tanto à temperatura, como pressão e desinfetantes empregados rotineiramente na indústria (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2013; CHAGNOT et al., 2014). Outro grande problema associado à formação de biofilme por *E. coli* é que em sorotipos patogênicos uma baixa concentração de UFC ingerida é suficiente para se estabelecer como dose infectante, dessa maneira, mesmo um biofilme fraco e de baixa qualidade pode promover a contaminação ou recontaminação de alimentos em instalações industriais

(MAROUANI-GADRI et al., 2010).

No presente estudo foi obtida uma prevalência da formação de biofilme em inox de 21,48%. O que ressalta uma séria preocupação no âmbito de processamento leiteiro devido à essa possibilidade, fato divergente do encontrado por Cherif-Antar et al. (2016), que dentre dos 18 isolados de *E. coli* provenientes de diversos pontos de laticínio, tanto antes como após a pasteurização, não verificaram a habilidade de produção de biofilme nessa estrutura.

Embora os trabalhos de silicone como superfície para formação de biofilmes sejam de número bastante reduzido quando se trata de isolados bacterianos provenientes de leite, é um material bastante relacionado com a capacidade de formação de biofilmes por micro-organismos devido às suas característicasde superfície propensa à adesão (WANG et al., 2012b) e seu uso bastante difundido na área médica, como em catéteres e próteses, sendo relacionado com o desenvolvimento de infecções nosocomiais (STICKLER; HEWETT, 1989).

O silicone é um material com grande biocompatibilidade e biodurabilidade, dessa maneira, apresenta ampla possibilidade de uso(WANG et al., 2012b). No caso deste estudo, sua utilização teve como objetivo levar a comparação com as teteiras utilizadas no ambiente de ordenha. Embora esse material tenha uma ampla capacidade de utilização devido às características supramencionadas, sua superfície é facilmente colonizada por bactérias (WANG et al., 2012b).

Embora não sejam encontrados muitos trabalhos de formação de biofilme em silicone associados com alimentos, os resultados deste estudo demonstraram uma alta prevalência de formação de biofilme neste material (56,38%), sendo a maior delas nos três materiais analisados. Em demais temáticas, é um problema relatado inclusive a capacidade de desinfetantes normalmente utilizados para a desinfecção desse material não serem capazes de eliminar células de biofilme nas concentrações de clorexidine, ácido acético e mandélico empregadas para esta função (STICKLER; HEWETT, 1989).

Além das características inerentes ao tipo de superfície empregado no processo de formação de biofilme, é necessário ressaltar os fatores associados aos próprios micro-organismos que levam a essa capacidade de organização.Os

detalhes moleculares que definem a formação de biofilmes ainda estão sendo discutidos e há inúmeras lacunas que carecem de elucidação (PRATT; KOLTER, 1998). Há estudos que associam diversos genes presentes nos isolados de *E. coli* com a produção de biofilme.

As fímbrias são estruturas protéicas, com função de adesão, tem espessura mais fina e apresentam-se em maior número do que os flagelos (DAHLBERG et al., 2009; VAN HOUDT; MICHIELS, 2005). As fímbrias são estruturas de aderência de *E. coli* que tem sido associadas às inúmeras etapas de formação de biofilme (FINLAY; FALKOW, 1989; VAN HOUDT; MICHIELS, 2005).Existem diversos tipos de fímbrias e os genes avaliados no presente estudo relacionados com a formação de biofilmes são associados a presença dessas estruturas.

O grupamento de genes *fim* codifica os componentes estruturais da organela fimbrial tipo I, que é a adesina mais frequente da família Enterobactericeae, bem como seus elementos regulatórios (FERNÁNDEZ; BERENGUER, 2000). Estudos realizados com mutantes nos genes *fim* demonstraram diminuição da ligação inicial durante a análise da formação de biofilme em superfícies abióticas como o policloreto de vinila (PVC) (PRATT; KOLTER, 1998).

No presente estudo foram obtidas as seguintes prevalências dos genes *fimA* e *fimE*: 100% e 99,3%, respectivamente. Como não houveram amostras negativas ou essas eram em número significativamente reduzido, não foi possível obter associação entre a produção de biofilmes nos três materiais e ambos os genes.

Outro tipo de adesina fimbrial, é a ECP (*E coli* common pilus), que é uma estrutura adesiva recentemente descrita e produzida pela maioria dos patotipos de *E. coli,* tanto em cepas intestinais como extra-intestinais (RENDÓN et al., 2007). Inicialmente essa estrutura foi descrita em cepas produtoras de meningite e denominada como fímbria dependente de temperatura (POUTTU et al., 2001).

Embora outros estudos tenham demonstrado que cepas mutantes deficientes de ECP tenham sido significativamente menos aderentes às células epiteliais (RENDÓN et al., 2007), esses achados vão de encontro com o observado *in vitro* nos ensaios realizados neste trabalho, em que foram

observadas associações negativas entre *ecpRAB* e os isolados positivos para a formação de biofilme em poliestireno, inox e silicone, como também entre *ecpA* e presença de biofilme em inox.

A respeito de outro tipo de fímbria, curli, o gene *csgD* coordena a expressão de determinantes para a formação de biofilme em *E. coli* (BROMBACHER et al., 2003). Ryu e Beuchat (2005)demonstraram que a produção de curliinfluencianaformação de biofilmeemaço inox. Entretanto, no presente estudo, embora tenha sido obtido a frequência de *csgD* em 96% dos isolados, não foi obtida associação verdadeira com a formação de biofilme em nenhum dos materiais utilizados (valor-P encontrado foi >0,05). Ainda, foi relatado que o gene *csgD* regula os determinantes de biossíntese de curli tanto positivamente quanto negativamente, dessa maneira, é possível que uma série de outros fatores estejam relacionados com esse processo (BROMBACHER et al., 2003).

Outra fímbria estudada é a fímbria de ligação à laminina, codificada pelo gene *elfA.* Essa estrutura é composta por fibras flexíveis capazes de ligarem-se à laminina protéica da matriz extracelular. Estudos *in vitro* revelaram que esse tipo de fímbria pode ter um papel na adesão de determinados patotipos de *E. coli*(FARFAN; TORRES, 2012). Em um trabalho realizado com amostras humanas, esse gene foi detectado em 72% das 71 amostras avaliadas, embora a estrutura protéica não tenha sido detectada em ensaio de imunofluorescência (HERNANDES et al., 2011).

Nas amostras analisadas provenientes de isolados de *E. coli* de leite de tanques de expansão, o gene *elfA* foi detectado em 100% delas. Por essa razão, não foi possível realizar o teste de associação do mesmo com a produção de biofilme nos três materiais analisados. Porém, ressalta-se da mesma maneira que o *fimA*, visto que ambos foram encontrados em todas as amostras avaliadas, o que pode indicar a participação na formação de biofilme de *E. coli* a partir de amostras de alimentos.

Outro tipo de fímbria analisada foi *E. coli* pilus hemorrágica, também conhecida como pili tipo IV, avaliada pela presença do gene *hcpA.* Além da capacidade de aderência dessa estrutura, ela também é relacionada com a inflamação na célula hospedeira causada por STEC (FARFAN; TORRES, 2012).

Essa estrutura foi encontrada em indivíduos que desenvolveram a síndrome urêmica hemolítica (SUH), mas não em pessoas saudáveis, sugerindo que sua produção ocorre *in vivo* (XICOHTENCATL-CORTES et al., 2007). A associação entre esse tipo de fímbria e a aderência de *E. coli* às células foi demonstrada por meio de indução de mutação no gene *hcpA* levando a interrupção do mesmo, que ocasionou a redução de aderência nas cepas mutantes (XICOHTENCATL-CORTES et al., 2007). Embora no presente estudo, esse gene tenha sido detectado em apenas 10/149 amostras (6,7%), foi observada uma associação positiva entre a sua detecção e a formação de biofilme em placas de poliestireno, valor-P = 0,0182, disponível na tabela 9.

Outra importante variante a ser descrita quanto à formação de biofilme é a susceptibilidade que os isolados tem quanto aos desinfetantes utilizados durante o toda a cadeira produtora dos alimentos. A escolha do desinfetante mais eficaz para a higienização de uma determinada superfície depende de uma série de fatores, tais como, a natureza da superfície de fixação, temperatura, tempo em que essa superfície ficou expostas às sujidades ou resíduos de alimentos, pH e a resistência intrínseca bacteriana formadora do biofilme (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010). Dentre os diferentes mecanismos de resistência do biofilme a desinfetantes, destaca-se a dificuldade do composto em penetrar a matriz exopolimétrica que compõe essa complexa estrutura, como também à possibilidade de neutralização do composto ativo nas regiões periféricas do biofilme (CHEN; STEWART, 1996).

No presente estudo, destaca-se o tempo de exposição da superfície, que leva a possibilidade do desenvolvimento do biofilme maduro, a ambos os agentes desinfetantes, iodo e digluconato de clorexidina. Pois com os resultados apresentados foi possível verificar que não houve a formação de biofilme quando essa foi induzida com a aplicação concomitante dos desinfetantes. Enquanto que, após a formação do biofilme maduro, com tempo de incubação de 72h, 25,40% (16/63) dos isolados de *E. coli* produtores de biofilme em placas de poliestireno apresentaram-se resistentes a pelo menos um dos desinfetantes empregados na análise.

Dessa maneira, o emprego de uma frequência adequada de desinfecção deve ser empregado a fim de evitar a maturação do biofilme e acúmulo de matéria

que pode servir como fonte de nutrientes para o mesmo, como é o caso da cadeia de produção de alimentos (SHARMA; ANAND; PRASAD, 2003). Além disso, os desinfetantes tornam-se menos eficazes quando sujidades ou partículas de alimentos estão presentes em uma superfície (SINDE; CARBALLO, 2000) e uma remoção incompleta decorrente de uma limpeza e desinfecção inadequada tende a facilitar a reinstalação de bactérias em uma superfície e formação de um novo biofilme (GIBSON et al., 1999).

6.4. Fatores de virulência em *E. coli* extraintestinais (ExPEC)

O patotipo de *E. coli* implicado em infecções extra-intestinais foi recentemente chamado de ExPEC. Os fatores de virulência a ele associados podem causar doença tanto em animais como em humanos. Inúmeros fatores influenciam os mecanismos de virulência de ExPEC, tais como as adesinas, toxinas, sideróforos e mecanismos de resistência ao soro(JOHNSON, 2003; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Ao avaliar-se os resultados obtidos de genes associados a fatores de virulência de *E. coli* extraintestinais, foram detectados somente os seguintes genes: *fimH* (100%), *hlyA* (5,4%), *irp2* (2,7%), *sitA* (10,7%), *ompT* (43,6%) e *traT* (98%).

O gene *hlyA* codifica a hemolisina enterohemorrágica de *E. coli* e está associado a diversos patotipos dessa espécie bacteriana (ASKARI BADOUEI et al., 2016). A hemolisina é um dos importantes fatores de virulência encontrados pois também contribui com diferentes mecanismos, tal como adesão, indução de respostas inflamatórias e danos às células epiteliais (BIELASZEWSKA et al., 2011).

Em hospedeiros animais, ExPEC precisa lidar com a baixa disponibilidade de ferro. Dessa forma, os isolados desse patotipo utilizam diferentes estratégias para recuperar o ferro sequestrado das proteínas hospedeiras. Uma dessas estratégias é o uso de sideróforos (GARÉNAUX; CAZA; DOZOIS, 2011), os quais estão amplamente distribuídos em espécies bacterianas, em que garantem o sequestro e transporte de ferro, necessários para sua multiplicação e metabolismo. Também fazem parte do arsenal de virulência de isolados de micro-organismos, como é o caso de *E. coli*(NEILANDS,

1993). Cada sideróforo apresenta propriedades específicas, permitindo maior adaptabilidade de ExPEC, tanto em condições ambientais como para superar a imunidade do hospedeiro (GARÉNAUX; CAZA; DOZOIS, 2011). Dentre todos os cinco genes de sideróforos analisados, a PCR detectou presença de genes codificadores de *irp2* e *sitA.*

As cepas de ExPEC também apresentam como fatores de virulência uma série de defesas contra os sistemas de defesa do hospedeiro. A maioria delas apresenta um revestimento de lipopolissacarídeos (LPS) que interferem na fagocitose e protegem contra a opsonização ou lise mediada pelo sistema complemento (JOHNSON, 2003). Essas cepas também podem expressar proteínas de membrana como traT, que aumenta a resistência ao soro, ou seja, aumenta a resistência ao sistema complemento(JOHNSON, 1991), e ompT, que pode clivar imunoglobulinas ou outras proteínas de defesa do hospedeiro (STATHOPOULOS, 1998).

Embora tenham sido detectados apenas seis dos 21 genes analisados descritos como fatores de virulência em ExPEC, esses desempenham inúmeros diferentes papéis para a infecção e desenvolvimento de doença no hospedeiro, ressaltando a importância de pesquisa dos mesmos em produtos de origem animal, que possam servir como veículo para transmissão de doenças.

6.5. Fatores de virulência em *E. coli* diarreiogênicas

A diarreia continua sendo sério problema em saúde pública, principalmente em países em que a população apresenta baixos índices sócio-econômicos. *E. coli* diarreiogênicas tem um importante papel como causa de doenças entéricas, a qual pode ser subdividida em cinco principais patotipos: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasora), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) e EAEC (*E. coli* enteroagregativa). Um dos grandes problemas associados a esses micro-organismos é o diagnóstico errôneo a eles relacionados, pois é necessário diferenciar as cepas patogênicas da microbiota normal do hospedeiro (ARANDA et al., 2007).

Com a utilização da PCR em maior escala, o diagnóstico de isolados de *E. coli* diarreiogênicas tornou-se mais viável, em que são determinados fatores de

virulência desses micro-organismos, porém para a completa elucidação da etiologia dessa enfermidade, necessita-se de um grande painel de genes a serem identificados (TOMA et al., 2003).

Dentre os genes avaliados neste trabalho para detecção de *E. coli* diarreiogênicas, nenhum deles foi detectado nos isolados analisados. Embora este fato não deva ser utilizado para afirmar que a etiologia de diarreia, principalmente em crianças, não envolva o leite cru como via de transmissão. Dessa maneira, ressalta-se a importância de estudos dessa natureza para melhor elucidação dos aspectos de virulência relacionados a *E. coli.*

Ressalta-se que houveram grandes avanços na pesquisa desse patógeno tanto na área humana, quanto veterinária, mas que ainda há ampla possibilidade de pesquisas que levem a melhor compreensão dos mecanismos de interação desse agente com os hospedeiros, com consequente possibilidade de maior controle de infecções. Considerando-se os aspectos estudados e os resultados, podemos apresentar as seguintes conclusões.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- Apresençadecepasresistentesadeterminadasclassesdeantimicrobianos pode estar associada com fármacos usualmente utilizados para tratamento de mastite nopaís;
- O alto número de isolados (36/149) com índice de multirresistência a antimicrobianos acima de 0,3 leva a uma preocupação quanto a emergência de patógenosmultiresistentes;
- A não identificação de cepas portadoras de ESBL ou de genes de formação do mesmo indicam que essa enzima não é um problema, pelo menos até o momento, nas propriedadesanalisadas;
- A formação de biofilme em diferentes materiais aponta a uma necessidade de adequada higienização de equipamentos, tanto nas propriedades como no ambienteindustrial;
- O uso de iodo e digluconato de clorexidina deve ser empregado dentro da periodicidade estabelecida, pois após a formação do biofilme maduro, isolados de *E. coli* podem não ser susceptíveis a esses agentes desinfetantes;
- Os genes associados a *E coli* common pilus tiveram uma associação negativa com a formação de biofilme nos diferentes materiais;
- Foram detectados genes associados a fatores de virulência em ExPEC nos isolados analisados;
- Nenhum dos isolados analisados apresentou genes associados a *E. coli* diarreiogênicas.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Heterogeneity in resistance to food-related stresses and biofilm formation ability among verocytotoxigenic Escherichia coli strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 3, p. 220–230, 2013.

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.

ASKARI BADOUEI, M. et al. Molecular characterization of enterohemorrhagic Escherichia coli hemolysin gene (EHEC-hlyA)-harboring isolates from cattle reveals a diverse origin and hybrid diarrheagenic strains. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, p. 342–348, 2016.

AVELINO, F. et al. The majority of enteroaggregative Escherichia coli strains produce the E. coli common pilus when adhering to cultured epithelial cells. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 7, p. 440–448, 2010.

BIELASZEWSKA, M. et al. Characterisation of the Escherichia coli strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: A microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 671–676, 2011.

BRADFORD, P. Extended-spectrum ß-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933–951, 2001.

BRASIL. Decreto-lei nº 923, de 10 de outubro de 1969. **Diário Oficial da União**, 1969.

BRASIL. Decreto nº 66.183, de 5 de fevereiro de 1970. **Diário Oficial da União**, 1970.

BRASIL. Instrução normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, p. 1–8, 2018a.

BRASIL. Instrução normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, p. 1–8, 2018b.

BRASIL. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil: informe 2018.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde., p. 16, 2019.

BROMBACHER, E. et al. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in Eschericia coli. **Microbiology**, v. 149, n. 10, p. 2847–2857, 2003.

BROWN, M. R. W.; ALLISON, D. G.; GILBERT, P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics a growth-rate related effect? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 22, n. 6, p. 777–780, 1988.

BUENO, V. F. F. et al. Influência da temperatura de armazenamento e do sistema de utilização do tanque de expansão sobre a qualidade microbiológica do leite cru. **Hig. aliment**, v. 18, n. 124, p. 62–67, 2004.

CAMERON, M. et al. Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Milk yield and somatic cell count in the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 4, p. 2427–2436, 2015.

CAPPITELLI, F.; POLO, A.; VILLA, F. Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled. **Food Engineering Reviews**, v. 6, n. 1–2, p. 29–42, 2014.

CASTILHO, I. G. et al. Host-pathogen interactions in bovine mammary epithelial cells and HeLa cells by Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6414–6421, 2017.

CHAGNOT, C. et al. Colonization of the meat extracellular matrix proteins by O157 and non-O157 enterohemorrhagic Escherichia coli. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 92–98, 2014.

CHEN, X.; STEWART, P. S. Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction-diffusion interaction. **Environmental Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 2078–2083, 1996.

CHERIF-ANTAR, A. et al. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. **Dairy Science and Technology**, v. 96, n. 1, p. 27–38, 2016.

CLAEYS, W. L. et al. Raw or heated cow milk consumption : Review of risks and bene

fi ts. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 251–262, 2013.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** [s.l: s.n.].

COSTA, E. O. et al. Identification of the coagulase-negative staphylococci isolates from bovine mastitis and evaluation of the inflammatory. **Proc. XXV Jubilee World Buiatrics Congress. Alapította, Budapest, Hungary.**, p. 73, 1998.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microscopy**, v. 49, p. 711–745, 1995.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.

CZECZULIN, J. R. et al. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p. 2692–2699, 1999.

DAHLBERG, S. et al. Review Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. **Cell Host and Microbe**, 2009.

DE FREITAS GUIMARÃES, F. et al. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2866–2872, 2013.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–189, 2002.

EWERS, C. et al. Molecular epidemiology of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 104, n. 1–2, p. 91–101, 2004.

EWERS, C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: How closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 3, p. 163–176, 2007.

FAGUNDES, H.; FERNANDES OLIVEIRA, C. A. Infecções intramamárias causadas por Staphylococcus aureus e suas implicações em paúde pública Staphylococcus aureus intramammary infections and its implications in public health -REVISÃO

BIBLIOGRÁFICA. **Ciência Rural**, v. 34434, n. 4, p. 1315–1320, 2004.

FARFAN, M. J.; TORRES, A. G. Molecular mechanisms that mediate colonization of shiga toxin-producing Escherichia coli strains. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 3, p. 903–913, 2012.

FERNÁNDEZ, L. A.; BERENGUER, J. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 21–44, 2000.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 210–230, 1989.

GARÉNAUX, A.; CAZA, M.; DOZOIS, C. M. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic Escherichia coli. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 89–98, 2011.

GHUYSEN, J.-M. Serine ß-Lactamases and penicillin-binding proteins. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 45, p. 37–97, 1991.

GIBSON, H. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 1, p. 41–48, 1999.

GOETZ, C. et al. Coagulase-negative staphylococci species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6454–6464, 2017.

GUH, A. et al. Outbreak of Escherichia coli O157 Associated with Raw Milk , Connecticut , 2008. v. 30329, n. 12, p. 1411–1417, 2010.

HAMMAD, A. M. et al. First Characterization and Emergence of SHV-60 in Raw Milk of a Healthy Cow in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 11, p. 1269–1272, 2008.

HERNANDES, R. T. et al. Fimbrial Adhesins Produced by Atypical Enteropathogenic Escherichia coli Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8391–8399, 2011.

HERRERO, M.; DE LORENZO, V.; NEILANDS, J. B. Nucleotide sequence of the iucD

gene of the pCoIV-K30 aerobactin operon and topology of its product studied with phoA and lacZ gene fusions. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 1, p. 56–64, 1988.

HONISH, L. et al. An Outbreak of E . coli O157 : H7 Hemorrhagic Colitis Associated with Unpasteurized Gouda Cheese. **Canadian Journal of Public Health**, v. 96, n. 3, p. 182–184, 2014.

HUANG, S. H. 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.

ISHIDA, H. et al. In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm- producing Pseudomonas aeruginosa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 7, p. 1641–1645, 1998.

JAYARAO, B. M. et al. A Survey of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk and Raw Milk Consumption Among Farm Families in Pennsylvania. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2451–2458, 2006.

JAYARAO, B. M.; HENNING, D. R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 10, p. 2157–2162, 2001.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 80–128, 1991.

JOHNSON, J. R. et al. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, iha and iroN(E. 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. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 17, n. 2, p. 261–278, 2003.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended Virulence Genotypes of Escherichia coli

Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261–272, 2000.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.

KASNOWSKI, M. et al. Biofilm formation in the food industry and surface validation methods. **Electronic Journal of Veterinary Medicine**, v. 15, p. 1–23, 2010.

KEENE, W. E. et al. A Prolonged Outbreak of Escherichia coli O157:H7 Infections Caused by Commercially Distributed Raw Milk . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 3, p. 815–818, 2009.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of Escherichia coli to identify high-risk sources of fecal contamination of foods . Multiple Antibiotic Resistance Indexing of Escherichia coli to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foodst. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 165–170, 1983.

LANGONI, H. et al. Cultivo microbiológico e a sensibilidade no isolamento de patógenos nas mastites bovinas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 4, p. 708–715, 2009.

LANGONI, H. Qualidade do leite: Utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 620–626, 2013.

LANGONI, H. et al. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1261–1269, 2017.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic Escherichia coli strains by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 1189–1193, 1992.

LEE, S. H. I. et al. Biofilm-producing ability of Staphylococcus aureus isolates from Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1812–1816, 2014.

LEJEUNE, J. T. et al. Longitudinal Study of Fecal Shedding of Escherichia coli

O157:H7 in Feedlot Cattle: Predominance and Persistence of Specific Clonal Types despite Massive Cattle Population Turnover. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 377–384, 2004.

LEONEL GONÇALVES, J. et al. Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against Prototheca zopfii isolates from bovine subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3613–3621, 2015.

LIU, X. et al. Resistance of biofilms to the catalase inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 2, p. 156–162, 1998.

MAROUANI-GADRI, N. et al. Potential of Escherichia coli O157:H7 to persist and form viable but non-culturable cells on a food-contact surface subjected to cycles of soiling and chemical treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 96–103, 2010.

MILANOV, D. et al. Investigation of biofilm formation and phylogenetic typing of Escherichia coli strains isolated from milk of cows with mastitis. **Acta Veterinaria**, v. 65, n. 2, p. 202–216, 2015.

NAM, H. M. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 2020–2026, 2009a.

NAM, H. M. et al. Antimicrobial resistance of enterococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 7–8, p. 698–701, 2009b.

NEILANDS, J. B. **SiderophoresArchives of Biochemistry and Biophysics**, 1993.

NERO, L. A.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M. M. S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão – PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 21, 2003.

NÓBREGA, D. B. et al. Molecular epidemiology and extended-spectrum β -lactamases production of. **Pesq. Vet. Bras**, v. 33, n. 7, p. 855–859, 2013.

OLIVER, S. P. et al. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 7, p. 793–806, 2009.

OOSTERIK, L. H. et al. Effect of serogroup, surface material and disinfectant on biofilm formation by avian pathogenic Escherichia coli. **Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 561–565, 2014.

PATERSON, D. L. et al. Bloodstream Isolates from Seven Countries : Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type ␣ -Lactamases. **Society**, v. 47, n. 11, p. 3554–3560, 2003.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of shiga toxigenic escherichia coli by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic E. coli hlyA, rfb(O111), and rfb(O157). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598–602, 1998.

PFALLER, M. A.; SEGRETI, J. Overview of the Epidemiological Profileand Laboratory Detection of Extended-Spectrum β-Lactamases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. Supplement_4, p. S153–S163, 2006.

POIREL, L.; BONNIN, R. A.; NORDMANN, P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative rods. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 5, p. 883–893, 2012.

POUTTU, R. et al. matB, a common fimbrillin gene of Escherichia coli, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 16, p. 4727–4736, 2001.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 285–293, 1998.

RAJALA-SCHULTZ, P. J. et al. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Veterinary Microbiology**, v. 102, n. 1–2, p. 33–42, 2004.

RAYMUNDO, N. K. L.; BERSOT, L. DOS S.; OSAKI, S. C. Consumer profile and problems associated with uninspected raw milk consumption in western Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, n. 0, p. 1–8, 2018.

RENDÓN, M. A. et al. Commensal and pathogenic Escherichia coli use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, n. 25, p. 10637–10642, 2007.

RIBEIRO, M. G. et al. Peracute bovine mastitis caused by Klebsiella pneumoniae. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 485–488, 2008.

RIBEIRO, M. G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. **Manual de terapêutica veterinária**, v. 3, p. 759–771, 2008.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E. et al. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, v. 36, n. 2, p. 241–256, 2005.

ROESCH, M. et al. Comparison of Antibiotic Resistance of Udder Pathogens in Dairy Cows Kept on Organic and on Conventional Farms. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 989–997, 2006.

RYU, J.-H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm formation by Escherichia coli O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 1, p. 247–54, 2005.

SÁ, M. E. P. DE et al. Importância do Staphylococcus aureus nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 320–326, 2004.

SALDAÑA, Z. et al. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing Escherichia coli and identification of Fis as a negative regulator of curli. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 992–1006, 2009.

SCALETSKY, I. C. A. et al. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic Escherichia coli strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3756–3759, 2009.

SCHMIDT, H. et al. Development of PCR for screening of enteroaggregative Escherichia coli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 701–705, 1995.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded

hemolysin of Escherichia coli O157:H7 strain EDL 933. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 3, p. 1055–1061, 1995.

SHARMA, M.; ANAND, S. K.; PRASAD, D. N. In vitro propagation of mixed species biofilms using online consortia for dairy processing lines. **Milchwissenschaft**, v. 58, n. 5–6, p. 270–274, 2003.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes to stainless steel, rubber and polytetrafluorehtylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 439–447, 2000.

SOMERS, E. B.; LEE WONG, A. C. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on Listeria monocytogenes biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 10, p. 2218–2229, 2004.

STATHOPOULOS, C. Structural features, physiological roles, and biotechnological applications of the membrane proteases of the OmpT bacterial endopeptidase family: a micro-review. **Membrane & cell biology**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 1998.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.

STEWART, P. S.; RAQUEPAS, J. B. IMPLICATIONS OF REACTION-DIFFUSION THEORY FOR THE DISINFECTION OF MICROBIAL BIOFILMS BY REACTIVE ANTIMICROBIAL AGENTS. **Chemical Engineering Science**, v. 50, n. 19, p. 3099–3104, 1995.

STICKLER, D.; HEWETT, P. Activity of antiseptics against Escherichia coli growing as biofilms on silicone surfaces. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 974–978, 1989.

STRALEY, B. A. et al. Gram-Negative Bacteria in Raw Bulk Tank Milk. v. 3, n. 3, p. 222–233, 2006.

TENNANT, S. M. et al. Characterisation of atypical enteropathogenic E. coli strains of clinical origin. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1–11, 2009.

TOLLEFSON, L.; FLYNN, W. T. Impact of antimicrobial resistance on regulatory policies in veterinary medicine: Status report. **AAPS PharmSci**, v. 4, n. 4, p. 1–2, 2002.

TOMA, C. et al. Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic Escherichia coli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2669–2671, 2003.

TÓTH, I. et al. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic Escherichia coli strains isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new cdt variant (type IV). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4285–4291, 2003.

TRABULSI, L. R.; ORDOÑEZ, J.; MARTINEZ, M. Enterobacteriaceae. In: Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 4ª Edição. **Editora Atheneu**, p. 269–276, 2005.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5–6, p. 626–633, 2005.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117–1131, 2010.

VAN KESSEL, J. S. et al. Prevalence of salmonellae, Listeria monocytogenes, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 2822–2830, 2004.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, n. 1–2, p. 179–185, 2003.

WANG, R. et al. Biofilm Formation by Shiga Toxin–Producing Escherichia coli O157:H7 and Non-O157 Strains and Their Tolerance to Sanitizers Commonly Used in the Food Processing Environment. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 8, p. 1418–1428, 2012a.

WANG, R. et al. Inhibition of escherichia coli and proteus mirabilis adhesion and biofilm formation on medical grade silicone surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 336–345, 2012b.

XICOHTENCATL-CORTES, J. et al. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 11, p. 3519–3529, 2007.

YAMAMOTO, S. et al. Detection of urovirulence factors in Escherichia coli by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 85–90, 1995.

YE, Y. et al. Inactivation of Cronobacter malonaticus cells and inhibition of its biofilm formation exposed to hydrogen peroxide stress. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 66–74, 2018.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry-Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125–148, 1994.

Anexos

9. ANEXOS

ANEXO 1. Atestado da pela Câmara de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ – UNESP/Botucatu, SP.

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

fmvz - unesp
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

ATESTADO

Atesto que o subprojeto intitulado "Caracterização molecular, perfil de sensibilidade e produção de biofilme de *Escherichia coli* isoladas de tanque de expansão de leite bovino", faz parte do Projeto de Pesquisa "E. coli, Klebsiella pneumoniae e Enterococcus spp.: Impacto dos fatores de virulência na mastite bovina e reflexos na saúde pública" **Protocolo CEUA 136/2017**, aprovado em 08/06/2017, a ser conduzido por **Sâmea Fernandes Joaquim**, para fins de pesquisa científica (Doutorado), e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Vigência do projeto	01/09/2017 a 31/03/2022
Finalidade	Pesquisa Científica
Espécie/Linhagem	Bovina / *Bos Taurus*
Raça	Holandesa
Nº de animais	2000
Peso/Idade	600 kg/06 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	FMVZ/Unesp - Botucatu

Botucatu, 03 de agosto de 2017

Profª. Ass. Drª. Ibiara Correia de Lima Almeida Paz

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Artigo científico

10. Artigo científico

O artigo científico decorrente desse trabalho será submetido na revista "Journal of Dairy Science".

As instruções para os autores dessa revista científica está disponível em: https://els-jbs-prod-cdn.literatumonline.com/pb/assets/raw/Health%20Advance/journals/jods/JDS_Instruct_for_Contributors_SF-1561399875737.pdf

Short Communication:

Biofilm formation on silicone, stainless steel, and polystyrene of *Escherichia coli* isolated from bulk tank milk

Sâmea F Joaquim[a], Felipe F. Guimarães[a], Simony T Guerra[a], Felipe M. Dalanezi[a], Bruna C. Lopes[a], Ana C. Yamakawa[a], Evelyn C. Silva[a], Márcio G. Ribeiro[a], José C. de F. Pantoja[a], Simone B. Lucheis[d], Vera L. M. Rall[b], Rodrigo T Hernandes[b], Domingos S. Leite[c], Helio Langoni[a]

[a] Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

[b] Department of Microbiology and Immunology, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

[c] Department of Genetics, Evolution, Microbiology, and Immunology, University of Campinas, UNICAMP, SP, Brazil.

[d]Paulista Agency of Agribusiness Technology, APTA, Bauru, SP, Brazil.

Abstract

In cases of mastitis, coliforms found in milk can be of animal origin or from flaws in the hygienic production of milk. The efficiency of pasteurization for inactivation of coliforms is directed linked to the presence of coliforms in the milk within the established limit, and the possibility of human infection is present if thermal treatment failures or in raw consumption. Molecular studies to identify strains of *Escherichia coli* in expansion tanks are incipient. Thus,

this study aimed to identify *E. coli* isolates in dairy expansion tanks and evaluate genes associated with virulence factors and formation of biofilms in different materials. We obtained a hundred and forty-nine *E. coli* isolates among which 42.28% (63/149) showed the ability to produce biofilms in polystyrene plastic, 21.48% (32/149) in stainless steel, and 56.38% (84/149) in silicone. Regarding the susceptibility of biofilm producers to iodine and chlorhexidine digluconate, both disinfectants were able to inhibit the formation of biofilm, but their efficiency was reduced in 25.40% of the samples after the formation of the mature biofilm. Genes related to biofilm production were detected and we observed a negative association between *E. coli* common pilus (ECP) genes and phenotypic production in the analyzed materials.

1. INTRODUCTION

There is a worldwide concern with the quality of the milk offered for consumption. The presence of coliforms in milk under the established limit guarantees the effectiveness of pasteurization. However, when there are failures in pasteurization or even when there is the consumption of the raw milk, humans can be exposed to risks of diseases (GUH et al., 2010).

There is a lack of data regarding the molecular identification of *E. coli* in expansion tanks. Milk from expansion tanks may contain pathogenic microorganisms (JAYARAO et al., 2006; JAYARAO; HENNING, 2001; STRALEY et al., 2006; VAN KESSEL et al., 2004) which may come from different sources, such as farm animals, mainly through mastitis, milking equipment or a contaminated milk cooling tank, and the dairy environment as a whole (LEJEUNE et al., 2004).

Despite the significant problems caused by biofilms in the food industry, the formation of biofilms in these environments is still poorly understood and the effective control of biofilms remains a challenge (CAPPITELLI; POLO; VILLA, 2014). The formation of biofilm depends on several different factors, among them, the ability of the microorganisms to adhere to the surface and develop the stages of formation of mature biofilm, nature of the fixation surface, and environmental factors present, such as temperature, pH, and availability of nutrients (VAN HOUDT & MICHIELS, 2010).

Another important variant to be described regarding the formation of biofilm is the susceptibility of strains to disinfectants used during food production. The choice of the most effective disinfectant for cleaning a given surface relies on many factors, such as the nature of

the surface, temperature, the time during which that surface was exposed to residues, pH, and intrinsic resistance of biofilm-forming bacteria to disinfectants (VAN HOUDT & MICHIELS, 2010).

Considering the importance of biofilms in the milk production chain and the impact it can have on public health, the present study investigated the ability of *E. coli* strains isolated from milk expansion tanks to produce biofilm in polystyrene, stainless steel, and silicone, the association of biofilm formation with genes encoding fimbriae and genes related to extra-intestinal *E. coli* virulence factors (ExPEC), in addition to the susceptibility of biofilm-forming isolates to iodine and chlorhexidine digluconate.

2. MATERIALS AND METHODS

This study was developed following the Ethics Committee on Animal Use guidelines (CEUA / FMVZ – UNESP/Botucatu, Sao Paulo state), Brazil, protocol number 136/2017.

Farms and *E. coli* isolates

Farms were eligible for the study if they met the following criteria: 1) Holstein or Holstein cross-breed cows, 2) farms with at least 200 lactating cows, 3) milk yield > 20 kg/cow/day, 4) bulk tank milk SCC< 400,000 cells/mL, 5) farms that used milk machines, and 6) farms with available electronic health and production records.

We analyzed 149 *E. coli* isolates from bulk tank milk derived from properties located in the states of Minas Gerais and São Paulo, Brazil. All milk samples were collected from 2017 to 2019.

Milk samples and diagnosis of *E. coli*

Milk samples were collected in sterile bottles and kept under refrigeration temperature until the moment of the microbiological analysis. We performed incubation of serial dilutions (10^0 to 10^{-3}) of the milk samples in broth Brain Heart Infusion (BHI) (proportion 1:10) for 37ºC / 4 hours followed by sowing 0.1 ml of each dilution in plates of chromogenic medium (Chromocult® Agar for coliforms, Merck Millipore) and incubation at 37ºC / 24 hours. Colonies compatible with *E. coli* were identified based on conventional phenotypic tests. All samples were homogenized before incubation steps.

Biofilm production characterization on silicone, stainless steel, and polystyrene

We tested for biofilm production according to the method of Vasudevan et al. (2003). Briefly, after overnight incubation at 35°C, the cultures grown in Luria Bertani (LB) were diluted (0.5 MacFarland scale) with turbidimeter, and aliquots of 200 µL were distributed in triplicate in 96-well polystyrene microplates (abiotic surface) and incubated at 35°C for 48 h. After washing with PBS (pH 7.4), the wells were stained with 1% crystal violet for 15 min, washed 3 times with the same buffer, dried, and submitted to spectrophotometer analysis at 540 nm wavelength. Uninoculated LB was used as a blank to correct the absorbance value.

For the stainless steel and silicone tests, we used washed, dried, and autoclaved coupons with a 1 cm diameter of 304 stainless steel or silicone. With sterile forceps, the plugs were deposited in a 24-well germ-free plate, with lid,subsequentially covered, in triplicate, with a 300 µl aliquot of the 10^8 CFU dilution, and incubated at 35ºC / 48h (OOSTERIK et al., 2014). The coupons were then transferred to a new plate. This step aimed to avoid the quantification of biofilm eventually produced in the surround polystyrene areas of the coupons of different materials. Once on the new plate, the procedures occurred as described for polystyrene.

Susceptibility test to disinfectant in the presence of biofilm

The strains with the ability to produce biofilm in polystyrene were subjected to the susceptibility test to disinfectants routinely used in milking lines, iodine and chlorhexidine digluconate.

To perform the test, the Minimum Bactericidal Concentration (CBM) was determined in three hours of incubation in Luria Bertani broth (LB). The bacterial inoculum was prepared in LB broth at a concentration of approximately 10^8 CFU / mL. For the test, a sterile 96-well microplate was used. A volume of 200 µL of the disinfectant at a concentration of 2% was added to the first well. From the initial well, serial dilutions of base 2 were performed and an aliquot of 100 µL of the bacterial suspension was added in each well, with resultant dilutions ranging from 1% to 0.5%. The microplate was homogenized and incubated at 35ºC / 3h. To obtain the CBM, a range of the content of each well was cultivated on TSA Agar at 35ºC / 24h. The CBM value was considered to be the lowest dilution of the disinfectant capable of completely inhibiting growth on the plate.

After determining the CBM, biofilm was produced in a 96-well microplate for 72 hours to form a mature biofilm. After this period, the wells were washed four times with sterile PBS,

and each time 200 µL of the disinfectant was inoculated. The plate was incubated at 35ºC / 3h. Subsequently, to confirm the efficiency of the antimicrobial, the content of each well was plated on TSA, aiming to observe the lack of growth. As a control, a well was inoculated only with LB.

Molecular characterization of genes associated with biofilm formation and extra-intestinal infections

A panel of 18 genes encoding adhesins (*fimA*, *fimH*, *ecpA*, *papA*, *papC*. *afaBC* and *sfaDE*), toxins (*hly*A, *vat*, *cnf*, and *cdt*), siderophores (*iroN*, *irp2*, and *iucD*), invasin (*ibe10*), and serum resistance (*traT, kpsMTll*, and *ompT*) were investigated.

Two different gene panels were used in this study. The first one contemplated genes encoding different types of fimbriae and related to the formation of biofilms: *fimA, fimE, ecpRAB, ecpA, csgD, elfA*, *and hcpA*. The second panel contained genes related to extra-intestinal *E. coli* virulence factors (ExPEC): adhesins (*fimH*, *iha, papA*, *papC*. *afaBC*, and *sfaDE*), toxins (*hly*A, *sat, vat*, *cnf*, and *cdt*), siderophores (*iroN*, *irp2*, *iucD, ireA*, *and sitA*), invasin (*ibe10*), and serum resistance (*traT, kpsMTll*, and *ompT*) were investigated.

Briefly, all colonies were suspended in 200 µL of sterile water, boiled for 10 min, frozen for 10 min. Then, the suspensions were centrifuged at 10,000 g for 1 min, and the supernatants were used for the polymerase chain reaction (PCR) as the DNA template. Each PCR reaction was composed by 2.0 µL of DNA template, 7.0 µL of Go Taq Green Master Mix (Promega, Madison. WI), 4.0 µL of nuclease-free H_2O and 0.34 µmol l^{-1} of each pair of primers, in a total volume of 15 µL. Amplification was performed in a thermocycler, and the fragments, the reactions were subjected to agarose gel electrophoresis (1.5%). The images were recorded by an image capture system.

Statistical analysis

Initially, frequency distributions were produced to describe the prevalence of the studied genes and the prevalence of biofilm-forming strains in the materials used. We used a logistic regression models (PROC LOGISTIC, SAS Institute, Cary, NC) to estimate the chances of biofilm formation among the studied materials. For each material studied, a Chi-square or Fisher test (PROC FREQ, SAS Institute) was used to compare the proportion of biofilm

formation between the positive and negative isolates for each researched gene. All analyses were performed at a significance level of 0.05.

3. RESULTS

Among one hundred and forty-nine *E. coli* strains isolated from bulk tank milk, 42.28% (63/149) demonstrated the ability to produce biofilm in polystyrene, 56.38% (84/149) in silicone, and 21.48% (31/149) in stainless steel. When adopting stainless steel as a reference, the odds ratio for the occurrence of biofilm formation in polystyrene was 2.68 (95% confidence interval: 1.61 to 4.46), and 4.72 (2.84-7.87) in silicone.

The prevalence of genes associated with fimbriae and ExPEC is available in table 1. When evaluating the results for ExPEC genes, we only observed *fimH* 100% (149/149), *hlyA* 5.4% (8/149), *irp2* 2.7% (4/149), *sitA* 10.7% (16/149), *ompT* 43.6% (65/149) and *traT* 98% (146/149). The association of genes related to biofilm production and ExPEC, with in vitro biofilm production in polystyrene, stainless steel, and silicone of *E. coli* isolates obtained from bulk tank milk is displayed in tables 2 and 3.

Sixty-three samples with the ability to produce biofilm in polystyrene were submitted to the determination of CBM for disinfectant susceptibility evaluation. None of the isolates formed biofilm when both disinfectants were added together with the bacterial inoculum and subjected to incubation for 3 hours. However, when iodine and chlorhexidine digluconate were added after the formation of mature biofilm (72 hours of incubation) and incubated for 3 hours, 25.40% (16/63) of the isolates demonstrated growth in the TSA medium for at least one of the agents tested.

4. DISCUSSION

The origin of microorganisms isolated from milk expansion tanks can be diverse, and the degree of qualification of dairy properties is an important factor altering this microbiota. The number of isolates tends to be lower in farms with a high degree of technology employed. Our results corroborate with this observation, and properties with a high level of management lead to a fewer number of *E. coli* isolates. In more specialized properties, the implementation of Good Agricultural Practices (GAP) avoid the milk of clinical and subclinical mastitis to reach the expansion tanks, a fact that has a direct impact on the number of isolates.

In recent years, although there are no studies demonstrating the organoleptic difference between raw and pasteurized milk, it occurred an increase in raw milk consumption due to an erroneous perception of the consumers linked to better quality and taste of the product (OLIVER et al., 2009). Still at odds with consumers perception, raw milk, and raw milk-derived products, as well as illegal products with no official inspection, are a threat to human health due the presence of pathogens, and also foreign substances added to the product, intentionally or not, as a result of frauds (RAYMUNDO; BERSOT; OSAKI, 2018).

The presence of microorganisms in raw milk, in addition to enabling the transmission of diseases, can lead to the formation of biofilms on both biotic and abiotic surfaces. These biofilms have a complex formation, which includes a wide variety of bacteria, which can lead both to food spoilage and to be pathogenic bacteria for consumers.

Biotic or abiotic surfaces presents several properties that can directly interfere in the formation of the biofilm, such as the roughness of the material, hydrophobicity, vulnerability to wear, and, for abiotic surfaces, the easiness of the material to be disinfected (VAN HOUDT& MICHIELS, 2010).

In food processing environments, both the place and equipment for obtaining milk and dairy products fit, the bacterial fixation is affected by the constituents of the food matrix. Exposure of surfaces to prolonged contact with food can lead to the fixation of microorganisms even on suitable surfaces and widely used in the industrial sphere, such as stainless steel (SOMERS & LEE WONG, 2004).

Equipment hygiene failures allow the accumulation of microorganisms on surfaces to lead to the formation of biofilms both in the dairy farm environment and in the dairy industry. The formation of biofilm in different materials, as presented in this study, leads to worrying questions about the recontamination of milk in the industry, which can lead to product deterioration and reduced shelf life (KASNOWSKI et al., 2010), as also, serious public health risks due to the possibility of disease transmission.

The materials used were chosen due to the possibility of comparison with other in vitro studies for the production and quantification of biofilms (polystyrene), such as to mimic the materials used in milking equipment (stainless steel and silicone) and the dairy industry (stainless steel). For this reason, 304 stainless steel was used, which, together with 316, are the most widely present austenitic grades for industrial purposes, due to physical/mechanical

features, thermal stability at different processing temperatures food, cleaning capacity, and high resistance to corrosion (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Among the results obtained, it was possible to observe the formation of biofilm in 42.28% of the isolates in polystyrene, 56.38% in silicone and 21.48% in stainless steel. A comparison was also made of the three materials in which the chance of biofilm being formed in polystyrene is 2.68 times greater than stainless steel and 4.72 times greater than silicone. It was already expected that stainless steel would be the material with the lowest biofilm formation on its surface, due to its characteristics (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994), which justify the choice of this material for industrial use.

Although polystyrene was chosen as the material for comparison with other studies of biofilm formation from *E. coli* isolates, publications on this theme are still scarce when it comes to milk samples. Milanov et al. (2015) investigated the production of biofilm both in LB medium and in tryptone soy broth (TSB) at two different temperatures: 20ºC and 37ºC using 25 isolates of *E. coli* from bovine mastitis cases. Biofilm production was verified in the LB at 64% at 20ºC and 56% at 37ºC, and in 68% at 20ºC and 24% at 37ºC in the TSB medium.

Different species and genera of microorganisms are also able to form biofilm in milk samples or the dairy environment. In Brazil, a study carried out with mastitic milk, milk from expansion tanks, milking equipment, and the hands of milkers, revealed the formation of Staphylococcus aureus biofilm in polystyrene (45.2%), stainless steel (41.9%) and rubber (38.7%) (LEE et al., 2014). In another Brazilian research, the ability to form *S. aureus* biofilms was studied both on biotic (bovine mammary epithelium cells and HeLa cells) and on abiotic surfaces (CASTILHO et al., 2017). Recently, some important pathogenicity factors of coagulase-negative Staphylococcus have been described as an influence of the biofilm formation of these pathogens on other species of the same genus (GOETZ et al., 2017).

We observed a biofilm prevalence of 21.48% in stainless steel, a result that highlights a serious concern in the scope of milk processing plants, once most equipment is made of this material. Our results differ from Cherif-Antar et al. (2016), where none of the 25 *E. coli* isolates from different dairy points collected before and after pasteurization could produce biofilm.

Although data focusing on silicone as a surface for biofilm formation are scarce when it comes to bacterial isolates from milk, it is a material that favors the formation of biofilm due to

its surface characteristics prone to adherence (WANG et al., 2012b). Also, Silicone is a material with great biocompatibility and durability and has several different uses (WANG et al., 2012b). In our case, the idea was to mimic the liners used in the milking environment. In the medical field, its widespread use, as in catheters and prostheses, highlights great importance for nosocomial infections (STICKLER; HEWETT, 1989) since its surface is easily colonized by bacteria (WANG et al., 2012b).

Here, we demonstrated a high prevalence of biofilm formation in silicone (56.38%), the highest among the three analyzed materials. This data is important because disinfectants usually used for the disinfection of silicone are not able to eliminate biofilm cells in the concentrations of chlorhexidine, acetic acid, and mandelic acid (STICKLER; HEWETT, 1989).

In addition to the characteristics inherent to the type of surface used in the biofilm formation process, it is necessary to highlight the factors associated with the microorganisms that lead to this organizational capacity. The molecular pathways defining the formation of biofilms are still unclear, and numerous gaps need to be clarified (PRATT; KOLTER, 1998).

Different studies associate several genes present in *E. coli* isolates with biofilm production. The fimbriae, a protein structure with an adhesion function, have been associated with numerous stages of biofilm formation (FINLAY; FALKOW, 1989; VAN HOUDT; MICHIELS, 2005). This structure has a thinner thickness and is more numerous than flagella (DAHLBERG et al., 2009; VAN HOUDT; MICHIELS, 2005). There are several types of fimbriae, and the genes evaluated here are correlated with the formation of biofilms and are associated with the presence of these structures.

The cluster of *fim* genes encodes the structural components of type I fimbrial organelle, which is the most frequent adhesin of the Enterobacteriaceae family, as well as its regulatory elements (FERNÁNDEZ; BERENGUER, 2000). Studies carried out with mutants in the end genes have shown decreased initial binding during the analysis of biofilm formation on abiotic surfaces such as polyvinyl chloride (PVC) (PRATT; KOLTER, 1998). In the present study, the following prevalences of *fimA* and *fimE* genes were, respectively, 100% and 99.3%. Since there were no negative samples for those genes, it was not possible to correlate them with the production of biofilms in the three materials.

Another type of fimbrial adhesion recently described is ECP (*E coli* common pilus). It is an adhesive structure produced by most *E. coli* pathogroups, both in intestinal and extra-

intestinal strains (RENDÓN et al., 2007). Initially, this structure was described in strains related to meningitis and named as temperature-dependent fimbria (POUTTU et al., 2001).

Although studies have demonstrated that mutant strains deficient in ECP have significantly less adherence to epithelial cells (RENDÓN et al., 2007), these findings corroborate with the *in vitro* test carried out by our group due to the lack of association between *ecpRAB* and positive biofilm-forming isolates in polystyrene, stainless steel, and silicone. Also, no correlation was observed between *ecpA*and the presence of biofilm in stainless steel.

Regarding the type curli of fimbriae, the *csgD* gene coordinates the expression of determinants for the formation of biofilms in *E. coli* (BROMBACHER et al., 2003). For Ryu and Beuchat (2005), the production of curli influences the formation of biofilm in stainless steel, however, in the present study, although the frequency of *csgD* was 96%, no true association was found with the formation of biofilm in any of the materials (P-value> 0.05). Still, several factors may be related to the process since the *csgD* gene up- and down-regulates the determinants of curli biosynthesis (BROMBACHER et al., 2003).

Another fimbria studied in this work, the laminin-binding fimbria encoded by the *elfA* gene, is a structure composed of flexible fibers capable of binding to the protein laminin of the extracellular matrix. This type of fimbria may play a role in the adhesion of certain *E. coli* pathotypes (FARFAN; TORRES, 2012). In a study carried out with human samples, the *elfA* gene was detected in 72% of the samples, although the protein structure was not detected in an immunofluorescence assay (HERNANDES et al., 2011).

In the samples analyzed from *E. coli* isolates from milk in expansion tanks, the *elfA* gene was detected in 100% of the samples. For this reason, it was not possible to find an association with the production of biofilm in the three analyzed materials. However, the presence of the *elfA*gene in all biofilm-forming samples may indicate participation in the formation of *E. coli* biofilm from food samples.

Another type of fimbria analyzed was hemorrhagic *E. coli* pilus, also known as type IV pili, evaluated by the presence of the *hcpA* gene. Aside from adherence, this structure is also related to inflammation in the host cell caused by STEC (FARFAN; TORRES, 2012). Type IV pili were found in individuals with the hemolytic uremic syndrome (SUH) but not in healthy people, suggesting that its production occurs in vivo (XICOHTENCATL-CORTES et al., 2007). The association between this type of fimbria and the adhesion of *E. coli* to cells was

demonstrated by inducing mutation in the *hcpA*gene, resulting in a reduction of adherence of the mutant strains (XICOHTENCATL-CORTES et al., 2007). Although we detected the *hcpA* gene in only 6.7% (10/149) of the samples, there is a positive association with the formation of biofilm in polystyrene (P-value = 0.0182).

In the present study, the surface exposure time stands out, this leads to the possibility of the development of mature biofilm, to both disinfectant agents, iodine and chlorhexidine digluconate. With the results presented, it was possible to verify that there was no biofilm formation when with the concomitant application of disinfectants. Instead, after the formation of the mature biofilm and with an incubation time of 72h, 25.40% (16/63) of the *E. coli* biofilm-forming isolates in polystyrene were resistant to at least one of the disinfectants used.

In this way, the use of an appropriate disinfection frequency must be employed to avoid the maturation of the biofilm and accumulation of matter that can serve as a source of nutrients for it, as is the case in the food production chain (SHARMA; ANAND; PRASAD, 2003). Also, disinfectants become less effective when dirt or food particles are present on a surface (SINDE; CARBALLO, 2000), and an incomplete removal due to inadequate cleaning and disinfection tends to facilitate the replacement of bacteria on a surface and formation of a new biofilm (GIBSON et al., 1999).

The *E. coli* pathotype implicated in extra-intestinal infections was recently called ExPEC, the associated virulence factors can cause disease in both animals and humans. Numerous factors influence the virulence mechanisms of ExPEC, such as adhesins, toxins, siderophores and mechanisms of resistance to serum (JOHNSON, 2003; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

The *hlyA*gene encodes *E. coli* enterohemorrhagic hemolysin and is associated with several pathotypes of this bacterial species (ASKARI BADOUEI et al., 2016). Hemolysin is one of the important virulence factors found as it also contributes to different mechanisms, such as adhesion, induction of inflammatory responses and damage to epithelial cells (BIELASZEWSKA et al., 2011).

In animal hosts, ExPEC needs to deal with the low availability of iron. Thus, the pathotype isolates use different strategies to recover the iron sequestered from host proteins. One of these strategies is the use of siderophores (GARÉNAUX; CAZA; DOZOIS, 2011), which are widely distributed in bacterial species, in which they guarantee the sequestration and

transport of iron, necessary for its multiplication and metabolism. They are also part of the virulence arsenal of microorganism isolates, such as E. coli (NEILANDS, 1993). Each siderophore has specific properties, allowing greater adaptability of ExPEC, both in environmental conditions and to overcome host immunity (GARÉNAUX; CAZA; DOZOIS, 2011). Among all five siderophore genes analyzed, PCR detected the presence of genes encoding *irp2* and *sitA*.

ExPEC strains also have some defenses against host defense systems as virulence factors. Most of them have a coating of lipopolysaccharides (LPS) that interfere with phagocytosis and protect against opsonization or lysis mediated by the complement system (JOHNSON, 2003). These strains can also express membrane proteins such as *traT*, which increases resistance to the serum, that is, it increases resistance to the complement system (JOHNSON, 1991), and *ompT*, which can cleave immunoglobulins or other host defense proteins (STATHOPOULOS, 1998).

Although only six of the 21 analyzed genes were detected as virulence factors in ExPEC, they play numerous different roles for infection and disease development in the host, highlighting the importance of researching them in products of animal origin, which can serve as a vehicle for disease transmission.

CONCLUSIONS

The formation of biofilm in different materials points to a need for adequate cleaning of equipment, both in properties and in the industrial environment. The use of iodine and chlorhexidine digluconate should be used quickly, because, after the formation of the mature biofilm, *E. coli* isolates may not be susceptible to these materials.

Thus, with the results obtained, it is emphasized that the study of the microbiota in milk from expansion tanks still needs to be elucidated. Despite the results obtained from biofilm formation on surfaces related to the milk production chain, there are many mechanisms yet to be studied and the disinfection of these surfaces remains a challenge.

REFERENCES

Álvarez-Ordóñez, A. et al. Heterogeneity in resistance to food-related stresses and biofilm formation ability among verocytotoxigenic *Escherichia coli* strains. **International Journal of**

Food Microbiology, v. 161, n. 3, p. 220–230, 2013.

Askari Badouei, M. et al. Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin gene (EHEC-hlyA)-harboring isolates from cattle reveals a diverse origin and hybrid diarrheagenic strains. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, p. 342–348, 2016.

Bielaszewska, M. et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: A microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 671–676, 2011.

Brombacher, E. et al. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Eschericia coli.***Microbiology**, v. 149, n. 10, p. 2847–2857, 2003.

Cappitelli, F.; Polo, A.; Villa, F. Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled. **Food Engineering Reviews**, v. 6, n. 1–2, p. 29–42, 2014.

Castilho, I. G. Et Al. Host-pathogen interactions in bovine mammary epithelial cells and HeLa cells by *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6414–6421, 2017.

Chagnot, C. et al. Colonization of the meat extracellular matrix proteins by O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli.***International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 92–98, 2014.

Cherif-Antar, A. et al. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. **Dairy Science and Technology**, v. 96, n. 1, p. 27–38, 2016.

Dahlberg, S. et Al. Review Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. **Cell Host and Microbe**, 2009.

Farfan, M. J.; Torres, A. G. Molecular mechanisms that mediate colonization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 3, p. 903–913, 2012.

Fernández, L. A.; Berenguer, J. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-

negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 21–44, 2000.

Finlay, B. B.; Falkow, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 210–230, 1989.

Garénaux, A.; Caza, M.; Dozois, C. M. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 89–98, 2011.

Gibson, H. Et Al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 1, p. 41–48, 1999.

Goetz, C. et al. Coagulase-negative staphylococci species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6454–6464, 2017.

Guh, A. et al. Outbreak of *Escherichia coli* O157 Associated with Raw Milk , Connecticut, 2008. v. 30329, n. 12, p. 1411–1417, 2010.

Hernandes, R. T. et al. Fimbrial Adhesins Produced by Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8391–8399, 2011.

Jayarao, B. M. et al. A Survey of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk and Raw Milk Consumption Among Farm Families in Pennsylvania. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2451–2458, 2006.

Jayarao, B. M.; Henning, D. R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 10, p. 2157–2162, 2001.

Johnson, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 80–128, 1991.

Johnson, J. R. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 17, n. 2, p. 261–278, 2003.

Kasnowski, M. et al. Biofilm formation in the food industry and surface validation methods. **Electronic Journal of Veterinary Medicine**, v. 15, p. 1–23, 2010.

Lee, S. H. I. et al. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1812–1816, 2014.

Lejeune, J. T. et al. Longitudinal Study of Fecal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Feedlot Cattle: Predominance and Persistence of Specific Clonal Types despite Massive Cattle Population Turnover. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 377–384, 2004.

Leonel Gonçalves, J. Et al. Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against *Prototheca zopfii* isolates from bovine subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3613–3621, 2015.

Marouani-Gadri, N. et al. Potential of *Escherichia coli* O157:H7 to persist and form viable but non-culturable cells on a food-contact surface subjected to cycles of soiling and chemical treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 96–103, 2010.

Milanov, D. et al. Investigation of biofilm formation and phylogenetic typing of *Escherichia coli* strains isolated from milk of cows with mastitis. **Acta Veterinaria**, v. 65, n. 2, p. 202–216, 2015.

Neilands, J. B. **SiderophoresArchives of Biochemistry and Biophysics**, 1993.

Oliver, S. P. et al. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 7, p. 793–806, 2009.

Oosterik, L. H. et al. Effect of serogroup, surface material and disinfectant on biofilm formation by avian pathogenic *Escherichia coli.***Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 561–565, 2014.

Pouttu, R. et al. matB, a common fimbrillin gene of *Escherichia coli,* expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 16, p. 4727–4736, 2001.

Pratt, L. A.; Kolter, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 285–293, 1998.

Raymundo, N. K. L.; Bersot, L. Dos S.; Osaki, S. C. Consumer profile and problems associated

with uninspected raw milk consumption in western Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, n. 0, p. 1–8, 2018.

Rendón, M. A. et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 25, p. 10637–10642, 2007.

Ryu, J.-H.; Beuchat, L. R. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 1, p. 247–54, 2005.

Sinde, E.; Carballo, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorehtylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 439–447, 2000.

Sharma, M.; Anand, S. K.; Prasad, D. N. In vitro propagation of mixed species biofilms using online consortia for dairy processing lines. **Milchwissenschaft**, v. 58, n. 5–6, p. 270–274, 2003.

Somers, E. B.; Lee Wong, A. C. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 10, p. 2218–2229, 2004.

Stathopoulos, C. Structural features, physiological roles, and biotechnological applications of the membrane proteases of the OmpT bacterial endopeptidase family: a micro-review. **Membrane & cell biology**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 1998.

Stickler, D.; Hewett, P. Activity of antiseptics against *Escherichia coli* growing as biofilms on silicone surfaces. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 974–978, 1989.

Straley, B. A. et al. Gram-Negative Bacteria in Raw Bulk Tank Milk. v. 3, n. 3, p. 222–233, 2006.

Van Kessel, J. S. Et al. Prevalence of salmonellae, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms

in bulk tank milk on US dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 2822–2830, 2004.

Van Houdt, R.; Michiels, C. W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5–6, p. 626–633, 2005.

Van Houdt, R.; Michiels, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117–1131, 2010.

Wang, R. et al. Inhibition of escherichia coli and proteus mirabilis adhesion and biofilm formation on medical grade silicone surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 336–345, 2012b.

Xicohtencatl-Cortes, J. et al. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 11, p. 3519–3529, 2007.

Ye, Y. et al. Inactivation of *Cronobacter malonaticus* cells and inhibition of its biofilm formation exposed to hydrogen peroxide stress. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 66–74, 2018.

Zottola, E. A.; Sasahara, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry-Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125–148, 1994.

Table 1. Absolute and relative prevalence of biofilm formation associated genes and ExPEC genes detection in 149*E. coli* isolated from bulk tank milk. Brazil, 2018-2019.

Virulence Factors	**Genes**				
Fimbriae	*fimA* 100% (149/149)	*fimE* 99.3% (148/149)	*ecpRAB* 34.2% (51/149)	*ecpA* 91.3% (136/149)	*csgD* 96.0% (143/149)
	elfA 100% (149/149)	*hcpA* 6.7% (10/149)			
Adhesins	*sfaDE* 0% (0/149)	*fimH* 100% (149/149)	*iha* 0% (0/149)	*papA* 0% (0/149)	*papC* 0% (0/149)
	afaBC 0% (0/149)				
Toxins	*hlyA* 5.4% (8/149)	*sat* 0% (0/149)	*vat* 0% (0/149)	*ehxA* 0% (0/149)	*Cnf* 0% (0/149)
	cdt 0% (0/149)				
Siderophores	*iroN* 0% (0/149)	*irp2* 2.7% (4/149)	*iucD* 0% (0/149)	*ireA* 0% (0/149)	*sitA* 10.7% (16/149)
Invasins	*ibe* 0% (0/149)				
Resistence to serum	*kpsMTll* 0% (0/149)	*ompT* 43.6% (65/149)	*traT* 98.0% (146/149)		

Table 2. Association of genes related to biofilm production with in vitro biofilm production in polystyrene, stainless steel and silicone of *E. coli* isolates obtained from bulk tank milk. Brazil, 2020.

Material	**Polystyrene**		**Stainless steel**		**Silicone**	
Genes	Biofilm production %(N)	P-value	Biofilm production %(N)	P-value	Biofilm production %(N)	P-value
fimA		N/A		N/A		N/A
Positive	42.28 (63/149)		21.48 (32/149)		56.38 (84/149)	
Negative	0.00 (0/0)		0.00 (0/0)		0.00 (0/0)	
fimE		1.00		1.00		1.00

Positive	42.57 (63/148)		21.62 (32/148)		56.08 (83/148)	
Negative	0.00 (0/1)		0.00 (0/1)		100.00 (1/1)	
ecpRAB		<0.0001		0.0035		0.0116
Positive	17.57 (9/51)		7.84 (4/51)		70.59 (36/51)	
Negative	55.10 (54/98)		28.57 (28/98)		48.98 (48/98)	
ecpA		0.0399		<0.0001		0.8473
Positive	44.85 (61/136)		15.44 (21/136)		56.62 (77/136)	
Negative	15.38 (2/13)		84.62 (11/13)		53.85 (7/13)	
csgD		0.6978		0.3414		1.00
Positive	41.96 (60/143)		22.38 (32/143)		56.64 (81/143)	
Negative	50.00 (3/6)		0.00 (0/6)		50.00 (3/6)	
elfA		N/A		N/A		N/A
Positive	42.28 (63/149)		21.48 (32/149)		56.38 (84/149)	
Negative	0.00 (0/0)		0.00 (0/0)		0.00 (0/0)	
hcpA		0.0182		0.1196		0.1040
Positive	80.00 (8/10)		0.00 (0/10)		30.00 (3/10)	
Negative	39.57 (55/139)		23.02 (32/139)		58.27 (81/139)	

Table 3. Association of genes related to the production of virulence factors for extra-intestinal *E. coli* (ExPEC) with the in vitro production of polystyrene, stainless steel and silicone biofilms from *E. coli* isolates obtained from bulk tank milk. Brazil, 2020.

Material	**Polystyrene**		**Stainless steel**		**Silicone**	
Genes	Biofilm production %(N)	P-value	Biofilm production %(N)	P-value	Biofilm production %(N)	P-value
sfaDE		N/A		N/A		N/A
Positive	0.00 (0/0)		0.00 (0/0)		0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)		21.48 (32/149)		56.38 (84/149)	
fimH		N/A		N/A		N/A
Positive	42.28 (63/149)		21.48 (32/149)		56.38 (84/149)	
Negative	0.00 (0/0)		0.00 (0/0)		0.00 (0/0)	
iha		N/A		N/A		N/A
Positive	0.00 (0/0)		0.00 (0/0)		0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)		21.48 (32/149)		56.38 (84/149)	
papA		N/A		N/A		N/A
Positive	0.00 (0/0)		0.00 (0/0)		0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)		21.48 (32/149)		56.38 (84/149)	

papC		N/A	N/A	N/A
Positive	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)	21.48 (32/149)	56.38 (84/149)	
afaBC		N/A	N/A	N/A
Positive	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)	21.48 (32/149)	56.38 (84/149)	
hlyA		0.2835	0.2024	0.0010
Positive	62.50 (5/8)	0.00 (0/8)	0.00 (0/8)	
Negative	41.13 (58/141)	22.70 (32/141)	59.57 (84/141)	
sat		N/A	N/A	N/A
Positive	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)	21.48 (32/149)	56.38 (84/149)	
vat		N/A	N/A	N/A
Positive	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)	21.48 (32/149)	56.38 (84/149)	
ehxa		N/A	N/A	N/A
Positive	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)	21.48 (32/149)	56.38 (84/149)	
cnf		N/A	N/A	N/A
Positive	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)	21.48 (32/149)	56.38 (84/149)	
cdt		N/A	N/A	N/A
Positive	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)	21.48 (32/149)	56.38 (84/149)	
iroN		N/A	N/A	N/A
Positive	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)	21.48 (32/149)	56.38 (84/149)	
irp2		0,1379	1.00	1.00
Positive	0.00 (0/4)	25.00 (1/4)	50.00 (2/4)	
Negative	43.35 (63/145)	21.38 (31/145)	56.55 (82/145)	
iucD		N/A	N/A	N/A
Positive	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)	21.48 (32/149)	56.38 (84/149)	
ireA		N/A	N/A	N/A
Positive	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)	21.48 (32/149)	56.38 (84/149)	
sitA		0.005	0.0236	0.0002
Positive	75.00 (12/16)	0.00(0/16)	12.50 (2/16)	
Negative	38.35 (51/133)	24.06 (32/133)	61.65 (82/133)	

ibe		N/A	N/A	N/A
Positive	0.00 (0/0)		0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)		21.48 (32/149)	56.38 (84/149)	
ompT		0.0651	0.4305	0.0006
Positive	50.77 (33/65)		18.46 (12/65)	72.31 (47/65)	
Negative	35.71 (30/84)		23.81 (20/84)	44.05 (37/84)	
traT		0.2629	0.0092	0.2572
Positive	43.15 (63/146)		19.86 (29/146)	55.48 (81/146)	
Negative	0.00 (0/3)		100.00 (3/3)	100.00 (3/3)	
kpsMTII		N/A	N/A	N/A
Positive	0.00 (0/0)		0.00 (0/0)	0.00 (0/0)	
Negative	42.28 (63/149)		21.48 (32/149)	56.38 (84/149)	

1