

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DOS PADRÕES DE SUSCEPTIBILIDADE
ANTIMICROBIANAS E SOROGRUPOS DE CEPAS DE
Escherichia coli ISOLADAS DE BOVINOS LEITEIROS,
PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DOS GENES *stx1*,
stx2 E *eae***

Gustavo Lacerda Homem Assumpção

Biólogo

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DOS PADRÕES DE SUSCEPTIBILIDADE
ANTIMICROBIANAS E SOROGRUPOS DE CEPAS DE
Escherichia coli ISOLADAS DE BOVINOS LEITEIROS,
PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DOS GENES *stx1*,
stx2 E *eae***

Gustavo Lacerda Homem Assumpção

Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

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

2013

Assumpção, Gustavo Lacerda Homem
A851a Avaliação dos padrões de susceptibilidade antimicrobianas e sorogrupos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de bovinos leiteiros, portadoras e não portadoras dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* / Gustavo Lacerda Homem Assumpção. – – Jaboticabal, 2013
III, 29 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo
Banca examinadora: Prof. Dr. Hélio José Montassier, Prof. Dr. José Carlos Rende
Bibliografia

1. *eae*. 2. *Escherichia coli*. 3. multirresistência. 4. STEC. 5. *stx1*. 6. *stx2*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 616.98:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

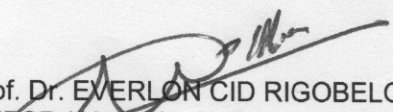
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

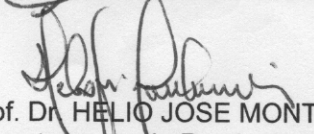
TÍTULO: AVALIAÇÃO DOS PADRÕES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANAS E SOROGRUPOS DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE BOVINOS LEITEIROS, PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DOS GENES *stx1*, *stx2* E *eae*

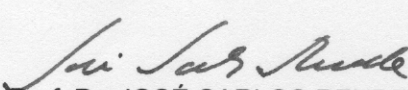
AUTOR: GUSTAVO LACERDA HOMEM ASSUMPÇÃO

ORIENTADOR: Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO
UNESP / Unidade de Dracena


Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. JOSÉ CARLOS RENDE
Universidade de Uberaba / Uberaba/MG

Data da realização: 11 de outubro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gustavo Lacerda Homem Assumpção, nascido em 21 de Janeiro de 1980, em Jaboticabal, SP. Solteiro. E-mail: glhassumpcao@yahoo.com.br. Escolaridade: Educação Básica e Fundamental; Colégio Santo André (1987-1997), Jaboticabal, SP. Educação Superior; Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharel) pela Universidade Federal de Uberlândia, MG (2001-2006). Especialização; Educação Ambiental e Desenvolvimento Sustentável , Lato Sensu (2008-2009). Pós-Graduação (Mestrado); Microbiologia Agropecuária pela Universidade Estadual Paulista, SP (2011-2013). Atividades Profissionais: Professor Estagiário; Colegio Rene Gianetti, Uberlândia (2003), Instituto de Educação ESEBA, Uberlandia (2004), Professor Substituto; Escola Nossa Senhora do Carmo, Jaboticabal (2006), Auxiliar de Laboratório; Farmácia Homeoderm, Jaboticabal (2007), Professor; Dórico Vestibulares, Jaboticabal (2010).

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.	01
REVISÃO DE LITERATURA.	02
MATERIAIS E MÉTODOS.	06
Coleta das amostras	06
Manutenção das cepas no laboratório.	07
Extração do DNA bacteriano, técnica de fervura.	07
Detecção dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> , através da técnica de PCR.	08
Procedimento do Multiplex PCR.	08
Técnica de aglutinação em lâmina.	09
Preparação do gel de agarose a 1,5% para eletroforese.	09
Teste de Sensibilidade a antimicrobianos.	10
Análise Estatística.	10
RESULTADOS.	11
DISCUSSÃO.	15
CONCLUSÃO.	21
REFERÊNCIAS.	22

AVALIAÇÃO DOS PADRÕES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANAS E SOROGRUPOS DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE BOVINOS LEITEIROS, PORTADORAS E NÃO PORTADORAS DOS GENES *stx1*, *stx2* E *eae*

RESUMO - O presente estudo foi realizado no período de janeiro de 2012 a janeiro de 2013 em fazendas leiteiras da região de Dracena, São Paulo. Durante o período, foram coletadas 800 amostras de fezes com suabes retais em vacas leiteiras. Essas amostras foram levadas para o Laboratório de Microbiologia do Campus Experimental de Dracena, onde foram isoladas e identificadas 561 amostras para *Escherichia coli*. Após o isolamento foram extraídos os DNAs de todas as amostras pelo método da fervura e por PCR o DNA foi amplificado para se detectar a presença dos genes de virulência de *E. coli* pertencentes ao grupo STEC, produtora de toxina tipo shiga em 446 amostras. De todas as cepas isoladas 90 eram portadoras do gene *stx1*, 97 do gene *stx2*, 45 do gene *eae*, 37 dos genes *stx1* e *stx2*, 110 dos genes *stx1* e *eae* e 67 dos genes *stx2* e *eae*. Foram isoladas também 115 cepas que não eram portadoras de nenhum dos genes de virulência de STECs do estudo. Todos os isolados de *E. coli* portadores de cada gene de virulência foram avaliados quanto a resistência frente a 10 antimicrobianos. Os percentuais de resistências aos antimicrobianos foram maiores para a lincomicina, penicilina e novobiocina e menores para ampicilina, neomicina e tetraciclina. Foram identificados os sorogrupos, dos quais os mais frequentes entre os isolados portadores do gene de virulência *stx1* foram o O119 e O114; do gene de virulência *stx2* foram os sorogrupos O9 e O8; e do gene de virulência *eae* foram os sorogrupos O9, O8 e O127. Todos os isolados de *E. coli* apresentaram multirresistência e a maioria apresentou maior percentagem de multirresistência contra 2 a 3 e contra 10 antimicrobianos. Não foi verificado estatisticamente relação entre os padrões de virulência e os padrões de resistência aos antimicrobianos entre as amostras.

Palavras-Chave: *eae*, *Escherichia coli*, multirresistência, STEC, *stx1*, *stx2*

EVALUATION OF ANTIMICROBIALS SUSCEPTIBILITY PATTERNS AND SEROGROUPS OF STRAINS OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM DAIRY CATTLE, BEARERS AND NO BEARERS OF GENES *stx1*, *stx2* AND *eae*

ABSTRACT - The present study was conducted between January 2012 to January 2013 on dairy farms of Dracena city region, São Paulo. During the period, 800 samples of faeces were collected with rectal suabs from dairy cattle cows. Those samples were taken to the laboratory of microbiology of Dracena Experimental Campus, where 561 samples were isolated and identified for *Escherichia coli*. After the DNA from the samples were extracted by the boiling method and with PCR the genetic material was amplified to detect the presence of virulence genes from STEC, shiga-like toxin producer *E. coli*, on 446 samples. Of those samples, 90 were carriers of the *stx1* gene, 97 of the gene *stx2*, 45 of the gene *eae*, 37 of the genes *stx1* and *stx2*, 110 of the genes *stx1* and *eae*, 67 of the genes *stx2* and *eae*. Also were isolated 115 samples that did not carry none of the virulence genes from STECs of the study. All the *E. coli* isolates of each virulence gene were evaluated for resistance to 10 antibiotics. The percentual of resistance were higher for lincomycin, penicillin and novobiocin and lower for ampicillin, neomycin and tetracycline. A serogroup test was made, of which the most frequent among isolates carrying the virulence gene *stx1* were O119 and O114; of the gene *stx2* were serogroups O8 and O9; and of the gene *eae* were the serogroups O9, O8 and O127. All the *E. coli* isolates presented multiresistance and most isolates presented more percentage of multiresistance against 2 to 3 and against 10 antibiotics. Was not verified statistically relationship between virulence patterns and patterns of antimicrobial resistance among the samples.

Keywords: *eae*, *Escherichia coli*, multiresistance, STEC, *stx1*, *stx2*

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a pecuária leiteira, na maioria dos estados, é constituída de criações cujas condições higiênico-sanitárias são precárias; exceto o gado produtor de leites tipos A e B. Alguns estudos realizados, principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, evidenciaram que os problemas causados pela *E. coli*, de modo geral, constituem uma das mais importantes causas da perda no rebanho bovino (CHARLES; FURLONG, 1992).

Animais domésticos como ruminantes, especialmente gado bovino, ovino e caprino são apontados como os principais reservatórios de cepas de STEC causadora de infecções em humanos. Entre os sorotipos de STEC, a O157:H7 é o que foi primeiramente associado com doenças enterohemorrágicas nos anos 80; como um surto de doenças transmitidas por alimentos. Desde então, todos os 100 sorotipos de STEC e outros que não são O157:H7, têm sido associados com doenças em humanos (MENG et al., 1998). Nos Estados Unidos aproximadamente 73.000 casos de infecções anualmente tem sido atribuídas as cepas de O157:H7, e mais de 36.000 foram atribuídas a cepas STEC não O157:H7 (MEAD et al., 1999). Existem mais de 100 mortes cada ano devido à infecções por STEC. Muitos estudos no Japão têm sugerido que a iniciação da antibioticoterapia em estágios recentes da infecção por STEC é capaz de prevenir a progressão da doença para síndrome urêmica hemolítica (SHU) (FUKUSHIMA et al., 1999). Entretanto, o tratamento com antimicrobianos para infecções por STEC é ainda considerado controverso; atualmente os muitos pacientes exigem tratamentos clínicos e ambulatoriais (SLUTSKER et al., 1997).

Os isolados de *Escherichia coli* produtora da toxina shiga, são considerados os mais importantes patógenos entre os grupos emergentes de origem alimentar. Este tipo de cepa é a maior causa de gastroenterite, além disso, pode ser responsável por causar colites hemorrágica (CH) ou síndrome urêmica hemolítica (SHU) que é a maior causa de falência renal aguda em crianças (BEUTIN et al., 1993).

Os isolados de *E. coli* do gado bovino têm apresentado um elevado índice de frequência de STEC cerca de 57%, e entre as variantes o gene para a codificação da toxina Stx1 tem sido mais frequentes do que a toxina Stx2 (ANDRADE et al., 2012). A presença de STEC não se limita ao gado com diarreia; Andrade et al., (2012) encontraram STECs entre os isolados de 66,7% dos animais apresentando diarreia e 37,5% dos animais que não apresentavam diarreia também foram portadores de cepas de STEC. Estudos realizados em São Paulo mostraram uma elevada frequência do gene *stx1* em cepas de STEC em animais apresentando ou não diarreia. Especificamente no gado leiteiro, os estudos realizados no Brasil mostraram uma porcentagem maior para a ocorrência do gene *stx2* em relação ao gene *stx1* (IRINO et al., 2005).

Nos últimos poucos anos, o uso de ferramentas moleculares para o diagnóstico e caracterização de *E. coli* patogênica em amostras de fezes de gado bovino tem aumentado, resultando em detecções de uma grande variedade de fatores de virulência em distintas regiões e seus genomas.

Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar se existe relação entre fatores de virulência e resistência antimicrobianos e também avaliar a frequência dos genes de virulência *stx1*, *stx2* e *eae* de cepas de *Escherichia coli* isoladas de vacas leiteiras da região de Dracena usando a técnica do PCR multiplex que pode ser aplicada para a identificação e caracterização dos genes de virulência de *E.coli* isolada de gado leiteiro e também avaliar os níveis de suscetibilidade frente a 10 antimicrobianos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

EHEC foram caracterizadas em 20 dos isolados em animais saudáveis e a presença do gene *eae* foi associado com apenas uma cepa apresentando o gene *stx1* em um estudo realizado por Andrade et al., (2012). Uma frequência similar foi encontrada por Aidar-Ugrinovich et al., (2007) que mostraram a associação dos

genes *stx1* e *eae* em gado bovino saudável. Outros autores postularam que mais cepas de EHEC são isoladas do gado com diarreia do que gado sem diarreia em distintas regiões do mundo que possuem o gene *eae* associado ao gene *stx1* (MAINIL et al., 1993; HORNITZKY et al., 2005).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado a presença de STEC e EHEC em fezes normais e diarreicas de bezerros. EHEC são considerados um subgrupo da STEC e muitos estudos têm insistido na importância do rebanho como um reservatório de diversos patógenos no Brasil e no mundo (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007). Outros estudos na mesma linha de investigação têm mostrados que ETEC são as maiores causas de diarreia neonatal nos primeiros três a quatro dias de vida dos bezerros de corte e para o gado de leite (NATARO & KAPER, 1998), e poucos estudos tem reportado ETEC em animais com mais de uma semana de idade. STEC são presentes em gado com idade de 6 a 28 dias e 30 a 57 dias e EHEC foram isolados de animais com idade de 12 a 26 dias e 46 a 57 dias enquanto que EPEC foi a menos isolada (ANDRADE et al., 2012). Os isolados de STEC, EHEC e EPEC podem afetar o gado em um intervalo de idade de 2 a 8 semanas e principalmente 1 a 5 semanas em animais mais velhos (DEBROY; MADDOX 2001) e a probabilidade de infecção por STEC incluindo EHEC foi significativamente maior na idade de 22 a 30 dias.

A transmissão da *E. coli* é caracterizada através do consumo de carne mal cozida, produtos lácteos não pasteurizados, vegetais e água contaminada por fezes contendo cepas de STEC. Inicialmente, *E. coli* O157:H7 foi encontrada como sendo susceptível para muitos antibióticos (FARINA et al., 1996) e muitos estudos recentes têm demonstrado a resistência aos antimicrobianos entre as cepas de isolados de *E. coli* O157:H7. As cepas de *E. coli* não O157:H7 isoladas de humanos e animais também têm desenvolvido resistências aos antimicrobianos, e muitas cepas estão resistentes a múltiplos antimicrobianos comumente usados em humanos e em medicina veterinária (FARINA et al., 1996). Existe (AARESTRUP et al., 1999) um acordo especulativo considerando o papel do uso terapêutico e sub-terapêutico em animais, como a força motriz na aceleração do desenvolvimento e na disseminação da resistência aos antimicrobianos pelas bactérias patogênicas. Novos estudos precisam urgentemente determinar o potencial efeito do uso dos antimicrobianos na

produção animal e no ambiente e a disseminação da resistência a antimicrobianos na medicina humana e veterinária.

Os agentes antimicrobianos são muito usados na terapia animal; para profilaxia e metafilaxia e em algumas regiões geográficas como promotores de crescimento. Muitas dessas drogas pertencem a mesma família de componentes antimicrobianos que são usados para o tratamento em humanos (WITTE, 1998). Estudos de sobrevivência (KADLEC; SCHAWRZ, 2008), conduzidos em diferentes países geralmente reportam um aumento do nível de resistência nos isolados de *E. coli* para a maioria das classes de antibióticos usados para o tratamento de animais domésticos e de estimação. Isso tem sido sugerido como um importante fator para a emergência e disseminação da resistência considerada como uma pressão seletiva exercida promovida pela exposição aos antibióticos.

As cepas de *E. coli* comensais, resistentes aos antimicrobianos podem constituir um significativo reservatório de determinantes de resistência que podem disseminar para bactérias patogênicas que acometem animais e humanos (WRIGHT, 2007). Por esta razão, a emergência da resistência reportada para as novas drogas, tais como betalactâmicos de espectro amplo e fluorquinolonas (FQS) é de particular preocupação para ambos, animais e de saúde pública. O potencial de transmissão de clones de *E. coli* entre diferentes hospedeiros animais e humanos tem sido documentado em estudos anteriores (JOHNSON et al., 2008). Adicionalmente, a transmissão de determinantes genéticos de resistência *in vitro* e *in vivo* têm sido descrito em diversos estudos (DANIELS, 2009; NAGACHINTA; CHEN, 2009). As cepas de *E. coli* com multirresistência são frequentemente associadas a infecções oportunistas (SANCHEZ et al., 2002). Entretanto, atualmente um conhecimento detalhado dos mecanismos em bactéria cultivada de animais hospitalizados ainda é limitado.

A disseminação de marcadores de resistência pode ser atribuída para um número independente de eventos genéticos coletivamente conhecidos como transferência de gene horizontal (HGT). Esses eventos ocorrem quando genes conferem resistência à antibióticos não específicos para uma bactéria do hospedeiro. O HGT tem sido atribuído a elementos genéticos móveis e mobilizados

tais como plasmídeos, transposons, e integrons. Esses elementos podem ser mapeados dentro dessas estruturas. Ademais, muitos marcadores persistem apesar da retirada de certos antibióticos do uso em terapia (BAGER et al., 1999 e SALYERS et al., 1997). A ligação física dos genes, em alguns casos, pode explicar, pelo menos em parte esses dados epidemiológicos (SUNDE; NORSTROM, 2006). A transferência da resistência a antibióticos por plasmídeos entre as bactérias de importância veterinária, incluindo *E. coli* em sido demonstrado *in vitro* e *in vivo* (DHANARANI et al., 2009 e NAGACHINTA; CHEN, 2008).

Um fator muito bem documentado é a associação de genes que codificam determinantes de virulência em *E. coli* patogênica com elementos móveis. Em *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) os genes que codificam ambas as toxinas LT e ST foram encontrados em plasmídeos, e estudos têm demonstrado que a atividade enterotóxica foi transferida juntamente com o mesmo plasmídeo. As toxinas shiga-like em STEC foram adquiridas de bacteriófagos *lambda* e pesquisas tem demonstrado que a habilidade para produzir Stx pode ser prontamente transmitida para transdução dos genes que codificam Stx no fago. Outros estudos têm demonstrado experimentalmente a adição ou a subtração de muitas características com base em modelos de cepas de *E. coli*, permitindo essas modificações nas cepas que irão causar diarreia em seus hospedeiros (KAPER et al., 2004).

Alguns autores sugerem que a infecção causada por cepas de *E. coli* não dependem da resistência dessas cepas aos agentes antimicrobianos e também não dependem do número de fatores de virulência que essas cepas possuem, mas da filogenia que essas cepas pertencem (LUO et al., 2012; IMAI, et al., 2010). Blum et al. (2013), analisando dois grupos de *E. coli* isoladas de gado leiteiro com mastite e do ambiente respectivamente, verificaram que a diversidade dos fatores de virulência das cepas isoladas do ambiente não refletiram a mesma diversidade dos fatores de virulência das cepas que estavam causando a infecção. Estes estudos sugerem que a seleção dos fatores de virulência ocorre independentemente da seleção da resistência antimicrobiana.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta das amostras

Durante o período de janeiro de 2010 a janeiro de 2012 foram coletadas 615 amostras de suabes retais de vacas leiteiras de fazenda leiteiras da região de Dracena. Após a coleta, essas amostras foram levadas para o Laboratório de Microbiologia do Campus Experimental de Dracena, cultivadas em agar MacConkey (que é seletivo para bactérias gram-negativas, e é diferencial para utilização de lactose) por 24 horas. As colônias nos meios foram identificadas após incubação por 24 e 72 horas a 37°C, como pertencentes a espécies em estudo (*Escherichia coli*) com base na coloração rósea do ágar de MacConkey, indicando a utilização de lactose, e com base em outros testes descritos a seguir (KONEMAN, et al., 1997):

Produção de indol; sintetizado pela ação da triptofanase sobre o triptofano existente no meio de cultura, ocorrendo, também, a produção de ácido pirúvico e amônia. O indol pode ser detectado pela formação de um anel rosa (*pink*) na parte superior do tubo, após a adição de *p*-dimetilaminobenzaldeído (reativo de Erlich); este teste foi positivo para as colônias deste estudo.

Reações de vermelho de metila; avalia se as bactérias fermentam a glicose pela via ácida mista, com a produção de vários ácidos (ácido fórmico, láctico, acético), o que prova o abaixamento do pH a menos 4,4, que é o limite de viragem do indicador de pH. Embora todas as enterobactérias fermentem glicose, alguns microrganismos, durante a fase final de incubação, convertem esses ácidos a produtos não ácidos como o etanol e a acetoína, resultando num pH mais elevado (pH 6). O indicador de pH é o vermelho de metila que em pH abaixo de 4,4 é vermelho e acima de 6 é amarelo; este teste foi positivo para as colônias deste estudo.

Utilização de citrato; determina se a bactéria é capaz de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono para o metabolismo e crescimento. Deve ser utilizado o meio Citrato de Simmons, contendo citrato de sódio, fosfato de amônia e azul de bromotimol. Com a facilidade do transporte de citrato pela citrato-permease há a sua utilização pela citrase, com produção de hidróxido de amônia que eleva o

pH, fazendo com que a reação se torne azul. Nesse teste, utilizam-se tubos com meio inclinado para a cultura ter mais acesso ao oxigênio, que é necessário para utilização do citrato. O CO₂ produzido reage com o sódio do citrato formando carbonatos de reação alcalina; este teste foi negativo para as colônias deste estudo.

Produção de urease; Há bactérias que possuem a enzima urease que garante a capacidade de degradar a uréia presente no meio liberando amônia, CO₂ e H₂O. A amônia reage formando carbonato de amônia que alcaliniza o meio. O indicador de pH é o vermelho de fenol que em meio alcalino toma a coloração magenta. Uma coloração meio rosa é suficiente para considerar a reação positiva; este teste foi negativo para as colônias deste estudo.

Produção de gás sulfídrico (H₂S); Algumas bactérias são capazes de degradar compostos contendo enxofre (como o tiosulfato de sódio e a cisteína das peptonas), através da tiosulfato redutase, produzindo H₂S que é incolor. Este reage com o ferro (indicador) formando um precipitado preto (sulfeto ferroso). Para que esta reação ocorra é necessário que o meio esteja ácido; este teste foi positivo para as colônias deste estudo.

Manutenção das cepas no laboratório

Após o isolamento, as cepas obtidas foram conservadas por meio de repique semanal em Placas de Petri, ou quinzenal em tubo de ágar inclinado, sempre em meio Luria-Bertani e conservado a 4° C em geladeira. Outras amostras foram conservadas em freezer a -20° C em 2 tubos de plásticos de microcentrífuga contendo 50% de cultura em Luria-Bertani e mais 50% de uma solução de glicerol a 70% em 37° C.

Extração do DNA bacteriano, técnica de fervura

O DNA microbiano foi extraído segundo a técnica proposta por Keskimäki et al. (2001), onde a colônia de *E. coli* isolada foi semeada e incubada a 37° C, por 12 horas, em um tubo de ensaio contendo 1 mL de meio Lúria Broth. Em seguida a cultura foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada a 15.000 rpm para a

precipitação das células e descarte do sobrenadante. As células precipitadas foram suspendidas em 250µL de água MilliQ estéril e agitadas em vortex por 30 segundos. A cultura bacteriana foi novamente precipitada, e o processo de lavagem repetido. Após a segunda lavagem com água MilliQ, o tubo eppendorf contendo a cultura foi colocado por 10 minutos em água fervente (100° C). Após esse tempo, as células foram precipitadas através de centrifugação 14.000 rpm durante 30 segundos, e então retirou-se uma alíquota de 150µL do sobrenadante e transferiu-se para outro tubo eppendorf. Esse material foi estocado em freezer a -20° C até o momento de uso.

Deteção dos genes *stx1*, *stx2*, *eae*, através da técnica de PCR

O DNA utilizado na detecção de cada gene foi aquele adequado para a técnica, no qual foi obtido através de um dos métodos acima descritos. As seqüências de bases dos oligonucleotídeos específicos usados neste estudo estão descritos abaixo. Esses oligonucleotídeos foram adquiridos da Isogen Bioscience. A amplificação do DNA bacteriano foi executada de acordo com o especificado por cada autor para a amplificação dos primers abaixo descritos. O produto da reação amplificado foi visualizado em gel de eletroforese contendo 10 uL do produto de PCR e 1,5% de gel de agarose. Foi utilizado o marcador molecular ΦX-174 Hae III digest.

Procedimento do Multiplex PCR

O PCR foi realizado segundo descrito por VIDAL et al., 2005. O DNA extraído por fervura foi tratado com 0,5% de triton X-100 por 20 minutos. Após esse tempo foi colocado 40µL da mistura à temperatura de 94°C por 5 minutos com a Taq polimerase (2U em 10µL da reação). A reação ocorreu em 35 ciclos sendo que cada ciclo durou 1,5 minutos à temperatura de 94°C para a desnaturação, 1,5 minutos à temperatura de 60°C para o anelamento e 1,5 minutos à temperatura de 72°C para a amplificação. Os primers utilizados foram: *stx1* – CAG TTA ATG TGG TGG GGA AGG – CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG, tamanho 348 pb; *stx2* – ATC CTA TTC

CCG GGA GTT TAC G – GCG TCA TCC TAT ACA CAG GAG C, tamanho, 584 pb;
eae – TCA ATG CAG TTC GGT TAT GAG TT – GTA AAG TCC GTT ACC CCA ACC
TG, tamanho 482pb.

Técnica de aglutinação em lâmina

Para a técnica de aglutinação em lâmina utilizou-se lâminas bem limpas e desengorduradas com álcool. A suspensão bacteriana usada era bastante espessa e a proporção suspensão/anti-soro era de uma alçada para uma gota normal dos soros PROBAC seguindo a técnica utilizada por Ávila et al. (1986)

Preparação do gel de agarose a 1,5% para eletroforese

A análise dos produtos obtidos pelo PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em cubas de diferentes tamanhos mantendo as seguintes proporções: 5µL de brometo de etídeo (10mg/mL) e 1,5g de agarose para cada 100mL de tampão TBE. Inicialmente, a quantidade exata de agarose (Sigma) foi pesada e transferida para um erlenmeyer, no qual foi adicionado o tampão TBE, completando o volume adequado. A mistura foi aquecida em forno microondas até que a agarose estivesse completamente dissolvida no tampão.

O brometo de etídeo foi usado como agente intercalante do DNA, permitindo a visão deste quando exposto à luz ultravioleta. O gel, ainda em estado líquido foi vertido sobre um suporte de acrílico contendo um ou dois pentes. Depois de solidificado, o gel foi colocado dentro da cuba de eletroforese e esta preenchida com tampão TBE. Os pentes foram retirados do gel, deixando presentes várias canaletas, nas quais foram aplicadas as amostras e um marcador de peso molecular (DNA do vírus ØX 174 digerido com HaeIII Pharmacia Bioscience). As amostras, antes de serem aplicadas no gel, foram acrescidas de 1/6 do volume final do tampão de carregamento, para que as amostras ficassem mais densas que o tampão da cuba, o que permitiu a deposição destas nas canaletas. A cuba foi ligada a uma fonte de corrente elétrica, fazendo com que o DNA, molécula carregada negativamente, migre em direção ao pólo positivo. Neste processo, fragmentos de DNA com

diferentes pesos moleculares, migraram em diferentes velocidades, fazendo com que ele se separem no gel.

O produto da reação foi separado por gel agarose em eletroforese acrescentando 5µL de carga de tintura contendo 0,25% azul de bromofenol em 40% de solução de sacarose e 2% de gel de agarose contendo brometo de etídio (1µg/mL). O tampão de eletroforese foi 0,5X Tris-Borato, EDTA e 100mA foi aplicado na frente do gel. O DNA no gel foi visualizado por exposição do gel em luz UV e fotografado.

Sensibilidade a antimicrobianos

Para a realização desses testes, as cepas de *E.coli* foram repicadas em tubos contendo 5mL de caldo tripicase soja, e incubadas a 37o C por 18 a 20 horas. Após a incubação, alíquotas das culturas foram gotejadas de forma asséptica em tubos contendo 4mL de solução salina esterilizada. A seguir as culturas diluídas na concentração 1/2 da escala de MacFaland foram semeadas com o auxílio de suabes estéreis, em placas contendo ágar Mueller-Hinton e, após aproximadamente 3 minutos (tempo necessário para a secagem da superfície do meio) foram colocados os polidiscos (Laborclin) contendo os antimicrobianos. A leitura foi realizada após 18 a 24 horas de incubação a 37o C através da medida dos halos de inibição, com a utilização de régua milimetrada (BAUER et al., 1966). Os diâmetros obtidos em milímetros foram comparados com a tabela fornecida pelo fabricante dos discos utilizados. Todas as amostras de *Escherichia coli* foram submetidas a testes de sensibilidade frente aos seguintes antimicrobianos: ampicilina, tetraciclina, trimetoprim, eritromicina, ácido nalidíxico, estreptomicina, novobiocina, lincomicina, penicilina e neomicina.

Análise Estatística

Os resultados das cepas de *E. coli* portadoras dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* frente aos 10 antimicrobianos foram comparados entre si e com as cepas não

portadoras de nenhum fator de virulência. O modelo usado foi o SAS software (2001). Em todas as comparações a significância foi confirmada quando o $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

De todas as 800 amostras coletadas durante o estudo, 561 foram isolados positivos para *E. coli*, das quais 90 eram portadoras do gene *stx1*, 97 do gene *stx2*, 45 do gene *eae*, 37 dos genes *stx1* e *stx2*, 110 dos genes *stx1* e *eae* e 67 dos genes *stx2* e *eae* totalizando 446 isolados positivos para os genes de virulência. Foram isoladas 115 cepas que não eram portadoras de nenhum fator de virulência isolado para comparação (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência dos fatores de virulência presentes em 446 cepas de *Escherichia coli* isoladas de vacas leiteiras na região de Dracena.

Fatores de Virulência/ Isolados	Número de isolados/ Amostras	Frequência (%)
<i>stx1</i>	90	11,2%
<i>stx2</i>	97	12,1%
<i>eae</i>	45	5,6%
<i>stx1</i> + <i>stx2</i>	37	4,6%
<i>stx1</i> + <i>eae</i>	110	13,7%
<i>stx2</i> + <i>eae</i>	67	8,4%
Total (Genes de virulência)	446	55,7%
Sem Genes de virulência	115	14,4%
Total de Isolados (<i>E. coli</i>)	561	70,1%
Amostras sem <i>E. coli</i>	239	29,9%
Total de Amostras	800	100%

De todas as cepas foram verificadas os níveis de resistência frente a 10 antimicrobianos sendo os valores mostrados nas figuras abaixo.

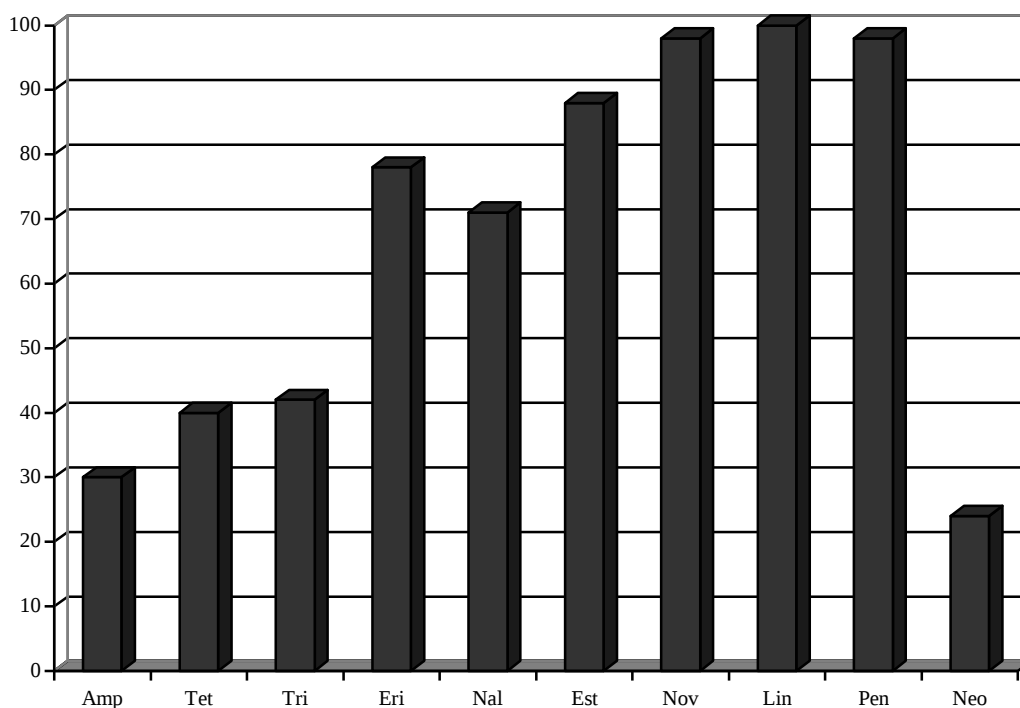


Figura 1. Padrões de resistência de 90 isolados de *Escherichia coli* todos portadores do gene *stx1*, provenientes de gado leiteiro da região de Dracena.

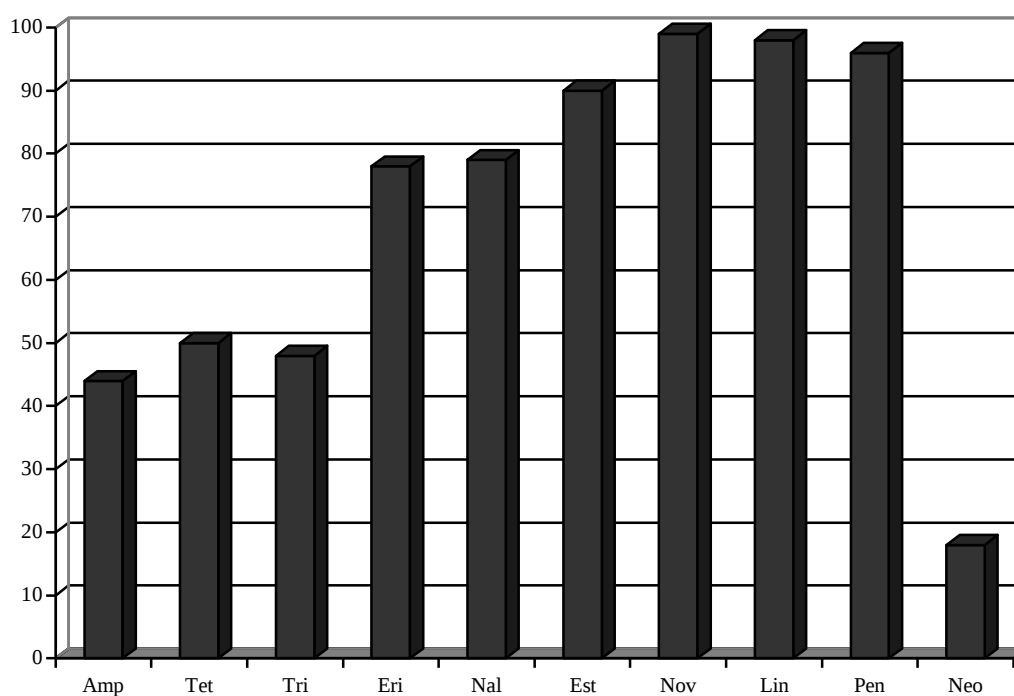


Figura 2. Padrões de resistência de 97 isolados de *Escherichia coli* todos portadores do gene *stx2*, provenientes de gado leiteiro da região de Dracena.

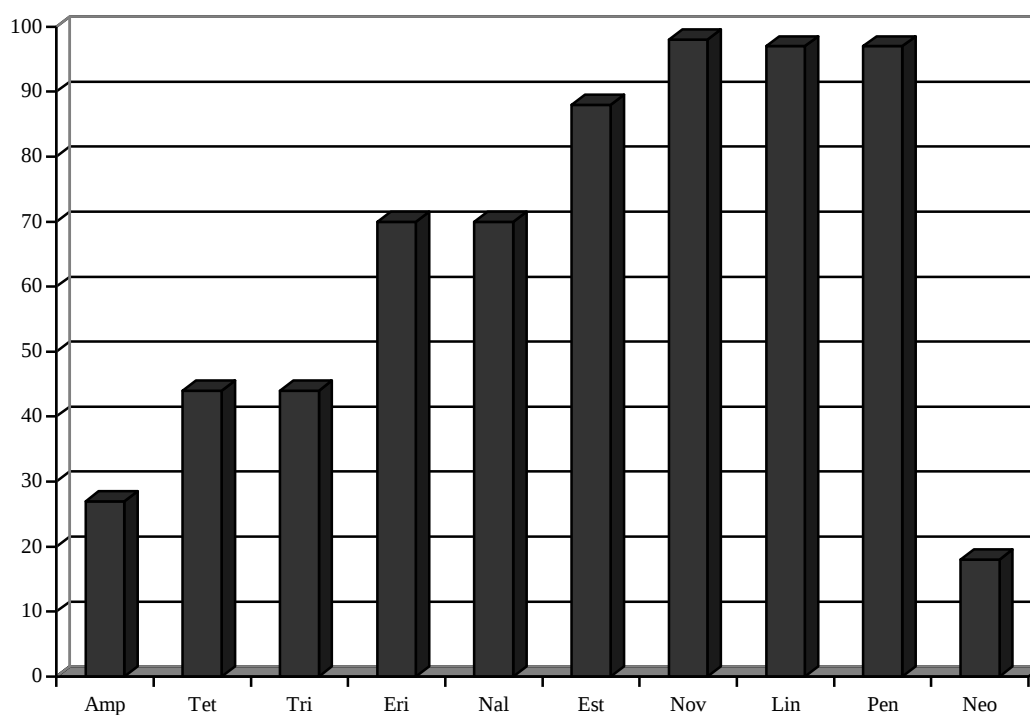


Figura 3. Padrões de resistência de 45 isolados de *Escherichia coli* todos portadores do gene *eae*, provenientes de gado leiteiro da região de Dracena.

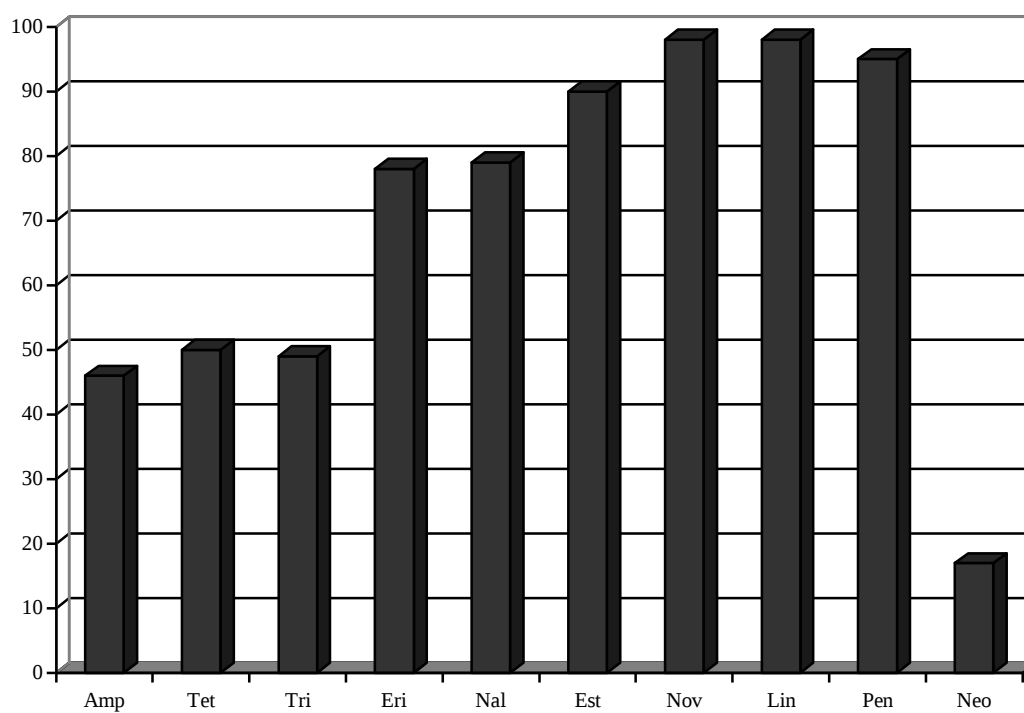


Figura 4. Padrões de resistência de 115 isolados de STEC sem genes de virulência *stx1*, *stx2* e *eae*

Nos gráficos abaixo são mostrados a frequência dos sorogrupos dos isolados entre as cepas de *E. coli* portadoras (para cada um dos três genes diferentes do estudo) e não portadoras de fatores de virulência.

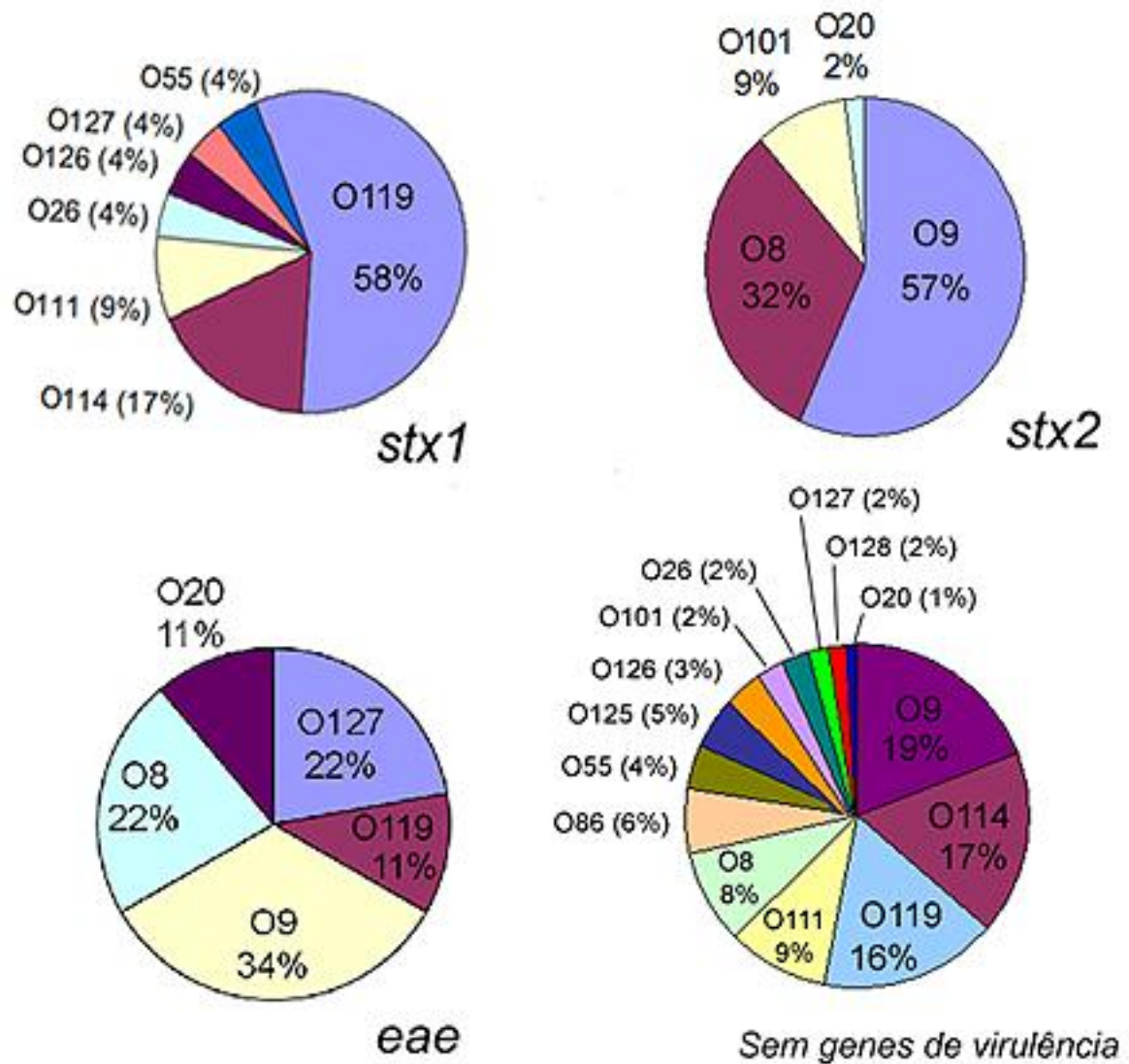


Figura 5. Frequência dos sorogrupos de 90 isolados de *Escherichia coli* portadores apenas do gene *stx1*, 97 portadores apenas do gene *stx2*, 45 portadores apenas do gene *eae* e 115 isolados de *E. coli* não portadores de nenhum dos genes de virulência, provenientes de gado leiteiro da região de Dracena.

Dentre os 10 diferentes sorogrupos de *E. coli* isoladas, os três mais frequentes foram O9 (17,3%) seguidos pelos sorogrupos O114 (16,2%) e O119 (15,6%) e os três menos frequentes foram O127 (2,3%), O128 (2,3%) e O20 (1,0%).

A figura abaixo demonstra o percentual de multiresistência das amostras de *E. coli* que se mostraram multirresistentes. Os maiores valores de multirresistência estão distribuídos de 2 a 3, seguidos de 10 antimicrobianos.

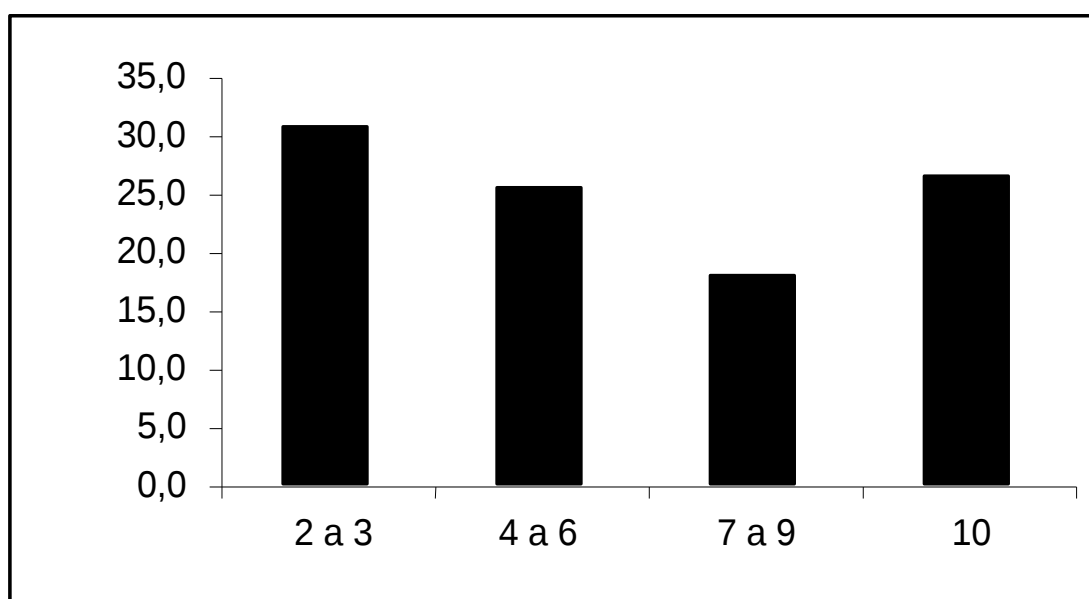


Figura 6. Distribuição da multirresistência detectada frente a 10 drogas antimicrobianas nas amostras de *E. coli* isoladas de gado leiteiro isoladas na região de Dracena. Eixo Y; % de resistência, eixo X; número de antibióticos aos quais houve resistência.

5. DISCUSSÃO

Analisando os padrões de resistência antimicrobianas dos isolados de *E. coli* portadoras e não portadoras dos fatores de virulência *stx1*, *stx2* e *eae* pode-se verificar que esses foram muito semelhantes demonstrando que os padrões de resistência aos antimicrobianos, nesse universo de isolados não depende da presença dos fatores de virulência (Figura 1,2 e 3). Nossos resultados demonstram que o fator de virulência e a resistência antimicrobiana são fatores independentes.

Entretanto, os resultados obtidos por outros autores são controversos. Alguns estudos estão de acordo com os resultados obtidos no presente estudo como relatam Mora et al. (2005) no qual, não encontraram relação entre resistência antimicrobiana e fatores de virulência em STEC. Entretanto, resultados relatados por Nagachinta et al. (2009) sugerem que pode existir uma possível relação entre ambos principalmente, quando a cepa carrega um gene para virulência e um gene para resistência antimicrobiana e esta é submetida a subdosagens como as usadas em promotores de crescimento. Nossos resultados diferem dos obtidos por Nagachinta et al., (2009) provavelmente por alguns motivos. Primeiro, nosso estudo verificou a relação de fatores de virulência que são transmitidos por fagos e estão localizados no DNA cromossomal com fenótipos de resistência antimicrobianas no qual os genes responsáveis por estes fenótipos são genes plasmidiais. Segundo no nosso estudo ao contrário do realizado por Nagachinta et al., (2009) para as resistências antimicrobianas verificou o fenótipo por difusão em disco e não a presença do gene. Existe a possibilidade de alguns genes incluindo os responsáveis por um fator de resistência antimicrobiana e outros responsáveis por fatores de virulência estarem formando um cassete e esses genes não estarem sendo expressos. Como fizemos a verificação da resistência aos antimicrobianos avaliando o fenótipo e não a presença do gene na bactéria o gene existente, mas que não esteja sendo expresso será considerado, por nossa avaliação como não existente. Por outro lado, era esperado que não houvesse uma associação entre os genes responsáveis pelos fatores de resistências e resistência aos antimicrobianos, uma vez que o primeiro são cromossomais e transmitidos pelo fado labda e o último são plasmidiais transmitidos por conjugação e ou transformação.

O uso de antimicrobianos na produção animal apresenta um potencial risco de transferência de genes tanto para humanos quanto para os animais. As disseminações dessas resistências possuem inúmeras implicações para a saúde pública podendo levar a ineficiência dos tratamentos terapêuticos, incluindo a morte ou o aumento do tratamento da doença bem como o aumento do custo de tratamento (KELLY et al., 2004).

Os valores encontrados no nosso estudo foram elevados para a maioria dos antimicrobianos usados. O uso de antimicrobianos é a força motriz de seleção de

cepas resistentes e muitas delas são patogênicas ou potencialmente patogênicas e fazem parte da microbiota normal de humanos e animais. Os agentes antimicrobianos frequentemente usados de referência em hospitais veterinários incluem drogas com atividades de largo espectro, tais como betalactamases e novas cefalosporinas bem como fluorquinolonas. Assim, animais hospitalizados podem constituir um importante reservatório de resistência antimicrobiana e essas resistências podem acometer os animais comerciais através da infecção por patógenos (GUARDABASSI et al., 2004). Estudos realizados por Karczmarczyk et al. (2011), analisaram 74 isolados de *E. coli* de um hospital veterinário e encontraram um nível de 80% os isolados pertencentes aos filogrupos A e B1 e são portanto classificados como bactérias comensais, mas um número de cepas, equivalente a 20% dentro do grupo D que foram classificados potencialmente como patogênicos. Bactérias das classes A e B1 são raramente reportadas possuindo genes de virulência (CLERMONT et al., 2000). Entretanto, apesar dos isolados se mostrarem comensais de humanos, estes apresentaram uma boa correlação de grupos filogenéticos com patogenicidade, *E. coli* (ExPEC) patogênica extraintestinal associado aos animais podem ser filogeneticamente distinta. Assim, uma melhor atenção deveria ser exercida quando uma cepa de *E. coli* fosse descrita como comensal (GHANBARPOUR; OSWALD, 2010). Ademais, cepas de *E. coli* podem causar doenças extraintestinal quando predisposta a fatores de infecção que estão presentes (RUSSO; JOHNSON, 2003). Por isso, apesar de mais isolados investigados em diversos estudos, estes podem ser classificados como organismos comensais e eles não são representativos de cepas comensais de animais saudáveis na comunidade.

Nós tentamos estabelecer uma relação entre os sorogrupos das cepas isoladas e para isso verificamos os sorogrupos dos isolados portadores e não portadores de fatores de virulência. Nossos resultados não demonstraram nenhuma evidência de preferência de um determinado sorogrupo pela presença de um ou mais gene de virulência. Não houve essa relação entre sorogrupo e fator de virulência (Tabela 1 e Figuras 6, 7 e 8). Um grande número de sorotipos foi coletado em gado sob investigação; os sorotipos se diferenciaram entre as respectivas espécies animais e entre as diferentes categorias de idade do gado bovino. A

questão que surge é qual é o papel de diferentes sorogrupos na contaminação de alimentos e como é feita essa contaminação. Sorogrupos O26, O91, O103, O111, O113, O121, O145 e O157 são conhecidos como causadores da síndrome urêmica hemolítica em humanos (KARMALI et al., 2010). No presente estudo para os isolados não portadores de nenhum fator de virulência o sorogrupo predominante foi o O9 seguido pelos sorogrupos O114, O119, O111 e O8 e os sorogrupos menos frequentes foram O20, O128 e O127 (Tabela2). Para os isolados portadores do gene de virulência *stx1* os sorogrupos mais isolados seguidos pelos menos isolados foram respectivamente, O119, O114, O111 e O55, O127 e O126 (Figura6). Para os isolados de *E. coli* portadoras dos gene *stx2* os sorogrupos mais isolado foi o O9 e o menos isolado foi o O20 (Figura7) e para os isolados portadores apenas do gene de aderência *eae* o sorogrupo mais isolado foi O9 e o menos isolado foi o O11 com a mesma frequência de isolamento o O20 (Figura9).

A frequência de STEC O157 em gado bovino foi representada por 10,2% das amostras de fezes coletadas em até 96% do rebanho (SARGEANT et al., 2003) e em 13% dos suabes retais de carne de touro de corte (LOW et al., 2005). Na América do Norte, Zhao et al., (1995) reportou o achado de STEC em 50% das fazendas de gado leiteiro e em 5,3% dos bovinos de idade de dois a quatro meses. Na Austrália, Fegan et al., (2004) detectou O157 em 10% das amostras de fezes do bovino sob pastejo e em 15% em amostras de fezes de animais em confinamento. Na Irlanda de 0 a 61% do gado leiteiro foram portadores de STEC e o mais elevado liberação de cepas de STEC pelas fezes foi encontrada em animais com idades de três a doze meses (HEUVELINK et al.,1998). Na Escócia, 6,5% do gado de idade de 12 a 30 meses tinham O157 nas fezes e 22% das fazendas foram positivas para o O157 (GUNN et al., 2007). Na Itália STEC O157 foram detectados em fezes de 42% dos animais (ALBONETTI et al., 2004) e em 24% das carcaças dos animais (ALONSO et al., 2007). Oporto et al. (2008) detectou STEC O157:H7 e não O157 em 3,8% e 35,9% do gado bovino respectivamente. Dados oriundos da Noruega mostraram achados de STEC O157 em até 75% dos animais examinados (URDAHL et al., 2003). No presente estudo não foram encontrados nenhum isolado de O157:H7 mostrando que esse sorotipo não é predominante no Brasil (Tabela2).

Tarr & Neil (1996) verificaram que as linhagens VTEC de outros sorogrupos que não o O157 representavam a grande maioria das linhagens VTEC isoladas de humanos, de bovinos ou de alimentos derivados de bovinos, chamando atenção para o fato que a pesquisa destes sorogrupos é sub-avaliada, porque tais patógenos não são detectados através do isolamento em placa de MacConkey Sorbitol cefiximia telurite, enfatizando a necessidade da utilização de técnicas moleculares para a correta detecção de cepas VTEC.

A ocorrência de cepas de *E. coli* produtoras da toxina Shiga em humanos e bezerros com diarreia foi muito bem relatada por Karmali (1989). Outros sorogrupos foram descritos considerando bezerros como um importante reservatório de cepas de *E. coli* produtora da toxina Shiga causadora de doenças em humanos (WELLS et al., 1991; BEUTIN et al., 1993).

Saridakis et al. (1997) procurando cepas de *E. coli* produtora da toxina Shiga em bezerros com diarreia do Estado do Paraná isolaram 19 amostras e relataram que 47% eram produtoras deste tipo de toxina. Bonardi et al. (1999) relacionaram a transferência de isolados de *E. coli* produtora de verocitotoxina de fezes para a carcaça de bovinos no norte da Itália. Foram analisadas 100 amostras de fezes de bovinos e 100 suabes de carcaças e verificaram que 35,3% das carcaças portadoras de *E. coli* VT+ possuíam também *E. coli* VT+ nas fezes anteriormente coletadas.

Conedera et al. (1997) e Bonardi et al. (1999) na Itália, mostraram que os percentuais de *E. coli* VT+ encontrados em fezes de bovinos variam de 0 a 13% e que a mesma porcentagem desta bactéria também é encontrada em carcaça.

Facteau et al. (2001) analisando 25 isolados de *E. coli* causadores de bacteremia em bezerros, relataram que seis amostras pertenciam ao sorogrupo O78 e três ao sorogrupo O119. Esses sorogrupos são frequentemente associados com a mortalidade de bezerros. Com exceção do sorogrupo O78, o sorogrupo O119 foi o terceiro sorogrupo mais freqüente como causa de diarreia em bezerros na presente pesquisa.

Wieler (1996), analisando 174 linhagens de *E. coli* isoladas de fezes de bezerros com diarreia na Alemanha e na Bélgica encontrou 17 diferentes sorogrupos, sendo que 79,5% das linhagens eram patogênicas e dentre elas O5, O26, O111 e O118.

Montenegro et al. (1990) demonstraram que 40% das linhagens de ETEC isoladas de bovino saudável pertenciam a sorogrupos reconhecidos como patógenos humanos e citaram como principais os sorogrupos O22, O39, O82, O91, O113, O116, O126 e O136.

A presença de classe 1 de integrons, associados com a resistência de trimetoprim, estreptomicina e sulfonamida tem sido mostrado em estudos anteriores. A variável de regiões de gene cassette caracterizada no estudo de Karczmarczyk (2011) foi reportada e são largamente disseminadas entre as Enterobacteriáceas (KADLEC; SCWARZ, 2008; MACHADO et al., 2005). Em adição, a classe de integrons 2 idênticos, associados com elementos transportáveis como Tn7-like e Tn7 tem sido identificados em estudos anteriores (BATCHELOR et al., 2005; MACHADO et al., 2005). A ausência da estrutura conservada 3' contendo *qacEΔ1sul* em muitos isolados tem sido reportado e tais elementos genéticos estão as vezes associados com o gene *sul3* (SOUFI et al., 2009).

O aumento e a disseminação de cepas de STEC resistentes aos antimicrobianos podem causar implicações clínicas, com sintomatologia entérica, embora o papel da terapia com antimicrobianos no início da infecção ainda seja obscuro e controverso (GRIFFIN, 1995). Existe a necessidade de uma vigilância continuada acompanhando o aumento de resistência a drogas antimicrobianas nos alimentos e nos animais, pois as cepas STEC representam um problema de saúde pública (MORA et al., 2005). Inicialmente, as cepas de STEC eram susceptíveis a muitos antibióticos (PAI et al., 1984; GRIFFIN & TAUXE, 1990; KIM, et al., 1994). O aumento da resistência dos microorganismos aos antimicrobianos pode levar a seleção de alguns fatores de virulências (NAGACHINTA et al., 2009). No entanto os dados existentes referentes aos mecanismos de resistência apresentados pelas cepas STEC ainda são insuficientes para a elaboração de explicações para o transito de fatores de resistência entre consideradas de origem humana e de origem animal. Os estudos precisariam caracterizar os genótipos de resistência observados entre cepas de STEC multiresistentes para se entender qual o papel dos genes na aquisição e disseminação de resistência antibióticos (ZHAO et al., 2001). Luo et al., (2012) sugere que a resistência antimicrobiana apresentada pela cepas de *E. coli* não determinam uma melhor eficiência para que a cepa desenvolva e progrida em

um infecção. Essa eficiência também não é melhorada pelo maior número de fatores de virulência que as cepas possuem, mas sim é determinado pela filogenia da cepa. O tipo de fator de virulência é mais determinante para a ocorrência da infecção do que o número de fatores.

Os ruminantes são reservatórios naturais de STEC e Mizan et al. (2002), sugere que o rúmen é um ambiente favorável para transformações genética por meio dos transportes de plasmídeos entre os microrganismos residentes e também os patogênicos dentro do hospedeiro bovino. Quando se estabelece uma relação entre genes de resistência antimicrobiana e fatores de virulência, neste caso, o agente antimicrobiano selecionaria o gene para a resistência antimicrobiana e consequentemente o gene para o fator de virulência, formando assim, uma relação. Heringa et al. (2010), sugere uma possível relação entre as cepas de *E. coli* no ambiente onde elas se encontram e esta relação mediada pelos fatores ambientais entre eles a presença de antimicrobianos. No presente estudo não foi verificado relação entre resistência antimicrobiana e fatores de virulência nossos resultados sugerem que a resistência antimicrobiana presente nos isolados não dependeram do tipo de fator de virulência que o isolado possuía. Esta afirmação ficou mais consistente analisando as porcentagens de resistência antimicrobianas apresentados por isolados que não possuíam nenhum dos três fatores de virulência estudados.

6. CONCLUSÕES

Os níveis de resistências foram elevados para penicilina, lincomicina e novobiocina sendo menores para neomicina, ampicilina, tetraciclina e ácido nalidíxico nas cepas portadoras dos três fatores de virulência sendo eles o *stx1*, *stx2* e o *eae*.

Entre os fatores de virulência mais apresentados entre os isolados foram a associação *stx1* e *eae* seguido pelo *stx2* e pelo *stx1*.

Não houve diferença estatística entre os padrões de resistência a antimicrobianos relacionados entre os isolados portadores dos genes de virulência

stx1, *stx2* e *eae* ($p>0,05$) mostrando que as cepas isoladas neste estudo não apresentaram relação entre os fatores de virulência e os fatores de resistências antimicrobianas.

Diante dos nossos resultados concluímos que os fatores de virulências *stx1*, *stx2* e *eae* não formam padrões como os genes de resistência testados, provavelmente por estarem respectivamente, no cromossomo bacteriano e nos plasmídeos e que também não há uma associação entre os sorogrupos e os fatores de virulência e resistência antimicrobianos. Essas características fenotípicas são selecionadas e expressadas de forma independente.

Todos os isolados foram resistentes a pelo menos dois antimicrobianos sendo o maior número de isolados multirresistentes entre 1 a 3 e 10 a 13 antimicrobianos.

Os sorogrupos mais frequentes entre os isolados de *E. coli* não portadoras de fatores de virulência foram O9, O114 e O119. Os sorogrupos mais frequentes para os isolados portadores dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* foram respectivamente, O119, O9, O9.

7. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. **Microb. Infect.** 1:639–644, 1999.

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D.L.; SILVEIRA, W.D.; CASTRO, A.F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, 115, 297–306, 2007.

ALBONETTI, S.; TREVISANI, M.; ALVAREZ, S.A.; ROSMINI, R. Detection of *Escherichia coli* serotype O157 in beef carcasses and faecal material. **Veterinary Research Communications** 28, 249–251, 2004.

ALONSO, S.; MORA, A.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DAHBI, G.; FERREIRO, M.T.; LOPEZ, C.; ALBERGHINI, L.; ALBONETTI, S.; ECHEITA, A.; TREVISANI, M.; BLANCO, J. Fecal carriage of *Escherichia coli* O157:H7 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. **International Microbiology**, v. 10, 109–116, 2007.

ANDRADE, G.I.; COURA, F.M.; SANTOS, E.L.S.; FERREIRA, M.; GALINARI, G.C.F.; FILHO, E.J.F.; CARVALHO, A.U.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B. Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. **Trop. Anim. Health. Prod.**, 44, 1783-1790, 2012.

BAGER, F.; AARESTRUP, F.M.; MADSEN, M.; WEGENER, H.C. Glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from broilers and pigs following discontinued use of avoparcin. **Microb. Drug Resist.** 5:53–56, 1999.

BASS, L.; LIEBERT, C.A.; LEE, M.D.; SUMMERS, A.O.; WHITE, D.G.; THAYER, S. G.; MAURER, J. J. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance in avian *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43:2925–2929, 1999.

BATCHELOR, M.; et al. *Bla*CTX-M genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. **Antimicrob. Agents Chemother.** 49:1319–1322, 2005.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M. M.; SHERRIS, J.G.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Path.**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEUTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-Like Toxin)-producing *Escherichia coli* in 7 different species of healthy domestic-animals. **Journal of Clinical Microbiology** 31, 2483–2488, 1993.

BLUM, J.W.; FROEHLI, D.; KUNZ, P. Effects of Catecholamines on Plasma Free Fatty Acids in Fed and Fasted Cattle. **Endocrinology Society. J ANIM SCI** 91: 382-394, 2013.

BONARDI, S.; MAGGI, E.; BOTTARELLI, A.; PACCIARINI, M.L.; ANSUINI, A.; VILLINI, G.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A. Isolation of verocytotoxin-producing *E. coli* O157:H7 from cattle at slaughter in Italy. **Vet. Microbiol.**, v.67, p.203-211, 1999.

CHARLES, T.P. & FURLONG, J. Eds. Diarréia dos bezerros. **Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL**, 1-138, 1992.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.** 66:4555–4558, 2000.

CONEDERA, G.; MARANGON, S.; CHAPMAN, P.A.; ZUIN, A.; CAPRIOLI, A. Atypical strains of cattle at slaughter in Veneto regions Italy. **J. Vet. Med.**, v.44, p.301-306, 1997.

DANIELS, J. B. et al. Role of ceftiofur in selection and dissemination of *bla*CMY-2-mediated cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* and

commensal *Escherichia coli* isolates from cattle. **Appl. Environ. Microbiol.** 75:3648–3655, 2009.

DEBROY, C.; MADDOX, C.W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. **Animal Health Research Reviews**, v. 2, 129–140, 2001.

DHANARANI, T. S.; et al. Study on acquisition of bacterial antibiotic resistance determinants in poultry litter. **Poult. Sci.** 88:1381–1387, 2009.

FARINA, C.; GOGGIO, A.; CONEDERA, G.; MINELLI, F.; CAPRIOLI, A. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157 and other enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Italy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 15:351–353, 1996.

FACTEAU, G.; PARÉ, J.; VAN METRE, D.C.; SMITH, B.P.; HOMBERG, C.A.; GUTERBOCK, W. A clinical sepsis score for predicting bacteremia in neonatal dairy calves. **Can. Vet. J.**, v.38, p.101-104, 2001.

FEGAN, N.; VANDERLINDE, P.; HIGGS, G.; DESMARCHELIER, P. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. **Journal of Applied Microbiology** 97, 362–370, 2004.

FUKUSHIMA, H.; HASHIZUME, T.; MORITA, Y.; TANAKA, J.; AZUMA, K.; MIZUMOTO, Y.; KANENO, M.; MATSUURA, M.; KONMA, K.; KITANI, T. Clinical experiences in Sakai City Hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai City, 1996. **Pediatr. Int.** 41:213–217, 1999.

GHANBARPOUR, R.; OSWALD, E. Phylogenetic distribution of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran. **Res. Vet. Sci.** 88:6–10, 2010.

GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. in Infections of gastrointestinal tract. eds Blaser M. J., Smith P. D., Ravdin J. I., Greenberg H. B., Guerrant R. L. (**Raven Press, New York, N.Y.**), pp 739–761, 1995.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.** 54:321–332, 2004.

GUNN G.J., MCKENDRICK I.J., TERNENT H.E., THOMSON-CARTER F., FOSTER G., SYNGE B.A. An investigation of factors associated with the prevalence of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 shedding in Scottish beef cattle. **Vet. J.** ;174:554–564, 2007.

HERINGA, S.; KIM, J.; MARION, W.; SHEPHERD, JR.; SING, R.; JIANG, X. The presence of antibiotics resistance and integrons in *Escherichia coli* isolated from compost. **Foodborn. Path. Dis.** 7, p. 1297-1304, 2010.

HORNITZKY, M. A., MERCECA, K., BETTELHEIM, K. A. & DJORDJEVIC, S. P. Bovine feces from animals with gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* that commonly possess intimin. **Appl Environ Microbiol** (*in press*), 2005.

HEUVELINK, A.E.; ZWARTKRUISNAHUIS, J.T.M.; HERBES, R.G.; HUYBEN, R.; NAGELKERKE, N.; MELCHERS, W.J.G.; MONNENS, L.A.H.; DE BOER, E. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch daily farms. **Journal of Clinical Microbiology** 36, 3480–3487, 1998.

IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; VAZ, T.M.I.; RAMOS, I.I.; SOUZA, M.A.C.; CRUZ, A.S.; et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Vet Microbiol**; 105(1): 29-36, 2005.

JOHNSON, R.P.; CLARKE, R.C.; WILSON, J.B.; READ, S.C.; RAHN, K.; RENWICK, S.A.; SANDHU, K.A.; ALVES, D.; KARMALI, M.A.; LIOR, H.; MCEWEN, S.A.; SPIKA, J.S.; GYLES, C.L. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection** 59, 1112–1122, 2003.

JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C.; KUSKOWSKI, M. A. Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members. **J. Clin. Microbiol.** 46:4078–4082, 2008.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. **J. Antimicrob. Chemother.** 62:469–473, 2008.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol** 2, 123–140, 2004.

KARCZMARCZYK, M.; ABBOTT, Y.; WALSH, C.; LEONARD, N.; FANNING, S. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from animals presenting at a University Veterinary Hospital. **Appl. Environ. Microbiol.** 77, 7104–7112, 2011.

KARMALI, M.A.; GANNON, V.; SARGEANT, J.M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology** 140, 360–370, 2010.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; STEELE, B.T. Infection by verocytotoxin producing *E. coli*. **Clini Microbiol. Rev.**, n.2, p.15-38, 1989.

KELLY, L.; SMITH, D.L.; SNARY, E.L.; JOHNSON, J.A.; HARRIS, A.D.; WOOLDRIGE, M.; MORRIS, J.R. Animal growth promoters: To ban or not to ban? A risk assessment approach. **Int. J. Antimicrob. Agent.** 24, 205- 212, 2004.

KESKIMAKI, M. et al. EPEC, EAC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** n.40, p. 151-156, 2001.

KIM, H.H.; SAMADPOUR, M.; GRIMM, L.; CLAUSEN, C.R.; BESSER, T.E.; BAYLOR, M.; KOBAYASHI, J.M.; NEILL, M.A.; SCHOENKNECHT, F.D.; TARR, P.I. The Characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State, 1984–1991. **J. Infect. Dis.** 170:1606–1609, 1994.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.; WINN, W.C. Antimicrobial Resistance, Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology, Fifth Edition, USA (Philadelphia), **LippincottRaven Publishers**. 15: 798-800, 1997.

LOW, J.C.; MCKENDRICK, L.J.; MCKECHNIE, C.; FENLON, D.; NAYLOR, S.W.; CURRIE, C.; SMITH, D.G.E.; ALLISON, L.; GALY, D.L. Rectal carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in slaughtered cattle. **Applied and Environmental Microbiology** 71, 93–97, 2005.

LUO, Y.; YANNING, M.; ZHAO, Q.; WANG, L.; GUO, L.; YE, L.; ZHANG, Y.; YANG, J. Similarity and divergence of phylogenies, antimicrobial susceptibilities and virulence factor profiles of *Escherichia coli* isolates causing recurrent urinary tract infections that persist or result from reinfection. **J. Clin. Microbiol.** 4002-4007, 2012.

MACHADO, E. et al. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. **Antimicrob. Agents Chemother.** 49:1823–1829, 2005.

MAINIL, J.G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **Journal of Applied Microbiology** 98, 1332–1344, 1993.

MEAD et al. Food Related illnesses . 1999. Food Related illnesses and death in the United States. **Emerging Infect Dis.** 5:607 and death in the United States. **Emerging Infect Dis.** 5:607--625, 1999.

MENG, J.; ZHAO, S.; DOYLE, M. P. Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. **Int. J. Food Microbiol.** 45:229–235, 1998.

MENG, J.; DOYLE, M. P. Microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. in *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. eds Kaper J., O'Brien A. (**ASM Press, Washington, D.C.**) pp 92–111, 1998.

MENG, J.; ZHAO, S.; DOYLE, M. P.; JOSEPH, S. W. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food, and humans. **J. Food Prot.** 61:1511–1514, 1998.

MIZAN, S.; LEE, M. D.; HARNON, B. G.; TKALCIC, M.; MAURER, J. J. Acquisition of antibiotic resistance plasmids by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 within rumen fluid. **J. Food Prot.** 65, 1038-1040, 2002.

MORA, A.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; ALONSO, P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLES, E.A.; BERNADEZ, M. I.; BLANCO, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans cattle, sheep and food in Spain. **Res. Microbiol.** 156, 793-806, 2005.

NAGACHINTA, S.; CHEN, J. Transfer of class 1 integron-mediated antibiotic resistance genes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to a susceptible *E. coli* K-12 strain in storm water and bovine feces. **Appl. Environ. Microbiol.** 74:5063–5067, 2008.

NAGACHINTA, S.; CHEN, J.R.; JINRU, T.I. Integron-Mediated Antibiotic Resistance in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection** v. 72, p.21-7, 2009.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews** 11, 142–201, 1998.

OPORTO, G.; FUENTES, R.; ÁLVAREZ, H.; BORIE, E. Recuperación de la morfología y fisiología maxilomandibular: Biomateriales en regeneración ósea. **Int. J. Morphol.**,26:853-9, 2008

PAI, C.H.; GORDON, R; SIMS, H.V; BRYAN, L.E. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. **Annals of International Medicine**, v. 101, p.738-742, 1984.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J.R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: an overlooked epidemic. **Microbes Infect.** 5:449-456, 2003.

SALYERS, A. A.; AMABILE-CUEVAS, C. F. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? **Antimicrob. Agents Chemother.**41:2321–2325, 1997.

SANCHEZ, S., et al. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. **J. Clin. Microbiol.** 40:3586–3595, 2002.

SARGEANT, J.M.; SANDERSON, M.W.; SMITH, R.A.; GRIFFIN, D.D. *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle feces and water in four major feeder-cattle states in the USA. **Preventive Veterinary Medicine** 61, 127–135, 2003.

SARIDAKIS, H. O.; GARED, E.L.; VIDOTTO, S.A.; GUTH, B.E.C. Virulence properties of *E. coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. **Vet. Microbiol**, n.54, p.145-153, 1997.

SLUTSKER, L.; RIES, A.; GREENE, K.; WELLS, J.; HUTWAGNER, L.; GRIFFIN, P. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. **Ann. Intern. Med.** 126:505–513, 1997.

SOUFI, L., et al. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. **Foodborne Pathog. Dis.** 6:1067–1073, 2009.

SUNDE, M.; NORSTRÖM, M. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 58: 741–747, 2006.

TARR, P. I.; NEILL, M. Perspective: the problem of non-O157:H7 shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli*. **Escherichia coli. J. Infect. Dis.** 174:1136-1139, 1996.

URDAHL, A.M.; BEUTIN, L.; SKJERVE, E.; ZIMMERMANN, S.; WASTESON, Y. Animal host associated differences in Shiga toxinproducing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattle on the same farm. **J Appl Microbiol** 95, 92–101, 2003.

VIDAL, M.; KRUGER, E.; PRADO, V.; DURAÍN, C.; TORO, C.; LAGOS, C.; LEVINE, M.; VIDAL, R. Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. **J. Clin. Microbiol.** p. 5362–65, 2005.

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

WIELER, L.H.; VIELER, E.; ERPENSTEIN, C.; SCHLAPP, T.; STEINRUCK, H.; BAUERFEIND, R.; BYOMI, A.; BALJER, G. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* Strains from Bovines: Association of Adhesion with Carriage of *eae* and Other genes. **J. Microbiol.** p. 2980-2984, 1996.

WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science** 279:996–997, 1998.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nat. Rev. Microbiol.** 5:175–186, 2007.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; SHERE, J.; GARBER, L. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157-H7 in a survey of dairy herds. **Applied and Environmental Microbiology** 61, 1290–1293, 1995.

ZHAO, S.; WHITE, D.G.; GE, B.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; ENGLISH, L.; WAGNER, D.; GAINES, S.; MENG, J. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1558-1564, 2001.