

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 25/07/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E VIRULÊNCIA DE
E. coli ISOLADAS DE MASTITE BOVINA COM DIFERENTES
NÍVEIS DE GRAVIDADE CLÍNICA**

SIMONY TREVIZAN GUERRA

Botucatu, SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E VIRULÊNCIA DE
E. coli ISOLADAS DE MASTITE BOVINA COM DIFERENTES
NÍVEIS DE GRAVIDADE CLÍNICA**

SIMONY TREVIZAN GUERRA

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária
como requisito para obtenção do título
de Doutora

Orientador: Prof. Associado Márcio Garcia Ribeiro
Área de concentração: Saúde Animal, Saúde Pública
Veterinária e Segurança Alimentar

Botucatu, SP

2019

Guerra, Simony Trevizan.

Resistência aos antimicrobianos e virulência de *E. coli* isoladas de mastite bovina com diferentes níveis de gravidade clínica / Simony Trevizan Guerra. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50502034

1. Bovino - Doenças. 2. Mastite. 3. *Escherichia coli*. 4. Fatores de virulência. Resistência microbiana a medicamentos.

Palavras-chave: ExPEC; Mastite ambiental; Mecanismos de virulência; Multirresistência bacteriana.

Simony Trevizan Guerra

**RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E VIRULÊNCIA DE *E. coli*
ISOLADAS DE MASTITE BOVINA COM DIFERENTES NÍVEIS DE
GRAVIDADE CLÍNICA**

Comissão Examinadora

Prof. Associado Márcio Garcia Ribeiro
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ - UNESP – Botucatu, SP

Prof. Titular Helio Langoni
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ - UNESP – Botucatu, SP

Doutor Felipe Freitas Guimarães
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ - UNESP – Botucatu, SP

Prof. Dr. Rogério Giuffrida
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – UNOESTE
Universidade do Oeste Paulista - Presidente Prudente, SP.

Prof^a. Dra. Amanda Keller Siqueira
Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS
Laranjeiras do Sul, PR.

Data da defesa

25 de julho de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Pedro Siqueira Guerra e Edmar Nilce Trevizan Guerra, que sempre incentivaram os estudos e batalharam muito para que meus sonhos se tornassem realidade.

Também dedico este trabalho às minhas irmãs, Bárbara T. Guerra e Marina T. Guerra, que sempre foram meus maiores exemplos e as melhores conselheiras. E à Helena e Elisa, meus anjinhos que tornaram a caminhada durante essa jornada mais leve e doce.

“Nem sempre temos a resposta para nossas questões.

Mas é importante saber se já estamos fazendo a pergunta certa”

(Pe. Fábio de Melo).

AGRADECIMENTO ESPECIAL

O presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Apoio financeiro (bolsa de mestrado) no período de outubro de 2015 a março de 2017;

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de doutorado direto a partir de abril de 2017, Processo n° 2017/08102-8, vinculado ao projeto temático intitulado “*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus* spp.: Impacto dos fatores de virulência na mastite bovina e reflexos na saúde pública (n°:2015/19688-8 (Projeto Temático).

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao professor Márcio Garcia Ribeiro, pelo incrível espírito de liderança e por toda confiança e generosidade. Um grande exemplo de líder, profissional e ser humano.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo milagre da vida e por tantas graças recebidas.

A minha família, por ser a minha fortaleza e acreditar em mim mais do eu mesma nos momentos de dificuldade.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP / Botucatu por ser minha casa desde a graduação.

Ao professor Helio Langoni pela oportunidade de trabalharmos juntos no Projeto Temático.

Ao professor José Carlos de Figueiredo Pantoja pela generosidade e por todo conhecimento compartilhado.

Ao técnico do laboratório de microbiologia e amigo Fernando José Paganini Listoni, por toda sua generosidade desde que cheguei ao laboratório.

Aos meus amigos Bruna Ribeiro, Júlia Cury, Lais Melício, Laiza Gavioli, Tália Tremori e Matheus Alfenas pelo apoio, torcida, amizade e incentivo de sempre.

Aos amigos que o Projeto Temático e a Pós-Graduação me trouxeram, Amanda Bezerra, Bruna Lopes, Felipe Dalanezi, Felipe Guimarães, Letícia Borges, Rodolfo Rossi e Sâmea Joaquim, vocês foram a melhor surpresa que poderia ter. A amizade, leveza e espírito de equipe de vocês realmente fizeram toda a diferença.

Aos colegas de laboratório Ana Carolina Alves, André Mota, Amanda Cordeiro, Carmen Bolaños, Carolina Lechinski e Fábio Portilho pela cooperação e companheirismo.

A todos os funcionários e servidores da FMVZ-UNESP por darem suporte à Universidade e à pesquisa.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Fatores de virulência (FV) de <i>E. coli</i> de mastite bovina no cenário mundial. 1989 - 2019	20
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características de rebanho, produção e instalações em 10 propriedades leiteiras localizadas nos Estados de Minas Gerais e São Paulo. Botucatu, SP, 2018 – 2019.	31
Tabela 2. Distribuição de estação do ano, dias em lactação paridade e quartos afetados em 114 casos de mastite clínica por <i>E. coli</i> . Botucatu, SP, 2018 – 2019.	32
Tabela 3. Tratamentos realizados em casos de mastite clínica bovina segundo diferentes níveis de gravidade clínica. Botucatu, SP, 2018 – 2019	32
Tabela 4. Valores de log para mínimo, mediana, máximo, primeiro e terceiro quartis de motilidade <i>swimming</i> e <i>swarming</i> em isolados de <i>E. coli</i> obtidos de casos de mastite clínica em vacas. Botucatu, SP, 2018 - 2019.	33
Tabela 5. Frequência relativa e absoluta de 114 <i>E. coli</i> isolados de vacas com mastite clínica, submetidas ao teste de sensibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos pelo método de difusão com discos. Botucatu, SP, 2018 – 2019	35
Tabela 6. Teste fenotípico de detecção de <i>E. coli</i> produtoras de ESBL obtidas de vacas com mastite clínica, pelo método de aproximação de discos em ágar. Botucatu, SP, 2018 – 2019	36
Tabela 7. Frequência absoluta e relativa de detecção de genes relacionados com ExPEC em 114 <i>E. coli</i> isoladas de vacas com mastite clínica. Botucatu, SP, 2018 – 2019	37
Tabela 8. Diferentes perfis de associação de 114 genes de <i>E. coli</i> , segundo a gravidade clínica, isoladas de vacas com mastite clínica. Botucatu, 2018 – 2019	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Motilidade *swimming* de 114 isolados de *E. coli* obtidos de vacas com mastite clínica. Botucatu, SP, 2018 – 2019 33
- Figura 2.** Motilidade *swarming* de 114 isolados de *E. coli* obtidos de vacas com mastite clínica. Botucatu, SP, 2018 – 2019 34
- Figura 3.** Teste de identificação fenotípica de ESBL em *E. coli* isolada de mastite clínica em vaca. É possível notar a formação da “zona fantasma”, que consiste na distorção do halo de inibição de multiplicação bacteriana entre amoxicilina/ácido clavulânico (centro da placa) e os antimicrobianos cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima dispostos no entorno (setas). Botucatu, SP, 2018 – 2019 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>afa</i>	Gene codificador de adesinas não fimbriais
<i>arpA</i>	Gene utilizado para classificação filogenética de <i>E. coli</i>
<i>astA</i>	Gene codificador de toxina EAST1
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>bfp</i>	Gene codificador do <i>Bundle forming pilus</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
<i>chuA</i>	Gene utilizado para classificação filogenética de <i>E. coli</i>
<i>colV</i>	Gene codificador de plasmídeo
<i>cdt</i>	Gene codificador da toxina <i>cytolethal distending toxin</i>
<i>cnf</i>	Gene codificador do fator citotóxico necrosante
<i>csgA</i>	Proteína constituinte de Curli
<i>csgB</i>	Proteína constituinte de Curli
<i>cs31A</i>	Gene codificador de adesina
<i>cva</i>	Gene codificador de plasmídeo
CCS	Contagem de Células Somáticas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNF	Fator Citotóxico Necrosante
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EaggEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<i>eae</i>	Gene codificador de <i>Escherichia coli attachment and effacing</i>
<i>east1</i>	Gene codificador de toxina EAST1
<i>ehly</i>	Gene codificador de hemolisina alfa
<i>ehxA</i>	Gene codificador de enterohemolisina
<i>einV</i>	Gene marcador para EIEC
<i>etx1</i>	Gene codificador de enterotoxinas 1
et al.	Colaboradores
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
ECD	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasoras
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extra-entérica
EPM	Escola Paulista de Medicina
ESBL	B-lactamase de espectro estendido
<i>f5</i>	Gene codificador de fímbria 5
<i>f165</i>	Gene codificador de fímbria 165
<i>fim</i>	Gene codificador de fímbria
FimF	Componente fimbrial minoritário de fímbria F
FimG	Componente fimbrial minoritário de fímbria G
FimH	Componente fimbrial minoritário de fímbria H

FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
<i>hly</i>	Gene codificador de hemolisina
HUS	<i>Hemolytic uremic syndrome</i>
<i>ibe10</i>	Gene codificador de invasina
<i>ijaA</i>	Gene utilizado para classificação filogenética de <i>E. coli</i>
<i>ireA</i>	Gene codificador de sideróforo
<i>irp 2</i>	Gene codificador de <i>yersin bactin</i>
<i>iroN</i>	Gene codificador de sideróforo
<i>iss</i>	Gene codificador de resistência ao soro
<i>iucD</i>	Gene codificador de sideróforo
<i>iutA</i>	Gene codificador de aerobactina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN 62	Instrução Normativa 62
IRMA	Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos
<i>kpsMTII</i>	Gene codificador de cápsula do grupo II
LB	Ágar Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	<i>Labile toxin</i> (enterotoxina termolábil)
MILi	Motilidade, indol e lisina
NMEC	<i>Neonatal meningitis caused by E. coli</i> "
MPEC	<i>Mastitis Pathogenic E. coli</i> "
<i>ompA</i>	Gene codificador de invasina
<i>pap</i>	Gene codificador da fímbria P
<i>pap C</i>	Gene codificador da fímbria P
<i>pap G</i>	Gene codificador da subunidade G da fímbria P
<i>saa</i>	Gene codificador de adesinas autoaglutinante
<i>sfa</i>	Gene codificador de fímbria S
<i>sitA</i>	Gene codificador de sideróforo
<i>stb</i>	Gene codificador de toxina
SfaA	Proteína majoritária da fímbria S
SfaG	Proteína componente da fímbria S
SfaH	Proteína componente da fímbria S
SfaS	Proteína componente da fímbria S
ST	Enterotoxina termoestável
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtoras da toxina de Shiga
STx	Toxina de Shiga
<i>tsh</i>	Gene codificador de hemaglutinina
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
<i>Vat</i>	Gene codificador de toxina
VT	Verotoxina
Fe II/ III	Íon ferro
Mi	Milhões
%	Porcentagem
Kb	Quilo bases
KDa	Quilo Dalton

Min	Minutos
°C	Graus Celsius
H	Horas
mcg	Microgramas
mL	Mililitros
mM	Milimol
µL	Microlitros
µM	Micrômetro
nº	Número
Pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
S	Segundos
v/v	Fração volumétrica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Leite no Brasil	2
2.2 Aspectos da mastite bovina.....	3
2.2.1. Mastite por agentes contagiosos e ambientais	6
2.2.2. Mastite clínica bovina por <i>Escherichia coli</i>	7
2.2.3 <i>E. coli</i> : propriedades gerais e fatores de virulência	9
2.2.3.1 Classificação filogenética.....	10
2.2.3.2 Fatores de colonização ou adesinas	11
2.2.3.2.1. Fímbrias	12
2.2.3.2.2 Fímbria tipo 1.....	12
2.2.3.2.3 Fímbria P.....	13
2.2.3.2.4 Fímbria S (pili S)	13
2.2.3.2.5 Fímbria curli	14
2.2.3.2.6 Antígeno 43	14
2.2.3.2.7 Fímbria tipo IV	14
2.2.3.3 Sideróforos.....	15
2.2.3.4 Endotoxinas	15
2.2.3.5 Exotoxinas.....	16
2.2.3.5.1 Hemolisinas	16
2.2.3.5.2 Fator de citotóxico necrosante (CNF).....	16
2.2.3.5.3 Toxina Shiga.....	17
2.2.3.6 Resistência ao soro	17
2.2.3.7 Invasinas	18
2.3 Fatores de virulência de <i>E. coli</i> de mastite bovina.....	18
2.4 Motilidade bacteriana.....	21
2.5 Resistência aos antimicrobianos	22
2.6 ESBL	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 Geral.....	25
3.2 Específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Comissão de ética.....	26
4.2 Propriedades.....	26

4.3 Diagnóstico da mastite clínica.....	26
4.4 Diagnóstico microbiológico de <i>E. coli</i> e estoque dos isolados.....	27
4.5 Testes de motilidade <i>swimming</i> e <i>swarming</i>	27
4.6 Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos – IRMA	28
4.7 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) fenotípica	28
4.8 Caracterização molecular dos isolados de <i>E. coli</i>	29
4.8.1 Extração do DNA de <i>E. coli</i> e pesquisa dos genes associados à virulência 29	
4.8.2 Determinação dos grupos filogenéticos.....	29
4.9 Universo amostral e análise estatística	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Motilidade <i>swimming</i> e <i>swarming</i>	34
5.2 Sensibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos	36
5.3 ESBL fenotípica.....	37
5.4 Pesquisa dos genes associados à virulência	38
5.5 Grupos Filogenéticos.....	41
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÕES	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
9. ARTIGO CIENTÍFICO	65

GUERRA, S. T. **Resistência aos antimicrobianos e virulência de *E. coli* isoladas de mastite bovina com diferentes níveis de gravidade clínica.** Botucatu, 2019. 101p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

RESUMO

Escherichia coli é o principal agente de mastite clínica bovina de origem ambiental, caracterizado pela complexidade de fatores de virulência (FV). O patógeno causa sinais clínicos que variam desde alterações exclusivamente no leite (grau 1 ou leve), no quarto afetado (grau 2 ou moderado), até manifestações sistêmicas (grau 3 ou grave). No entanto, até o momento, não está estabelecido o perfil de genes deste patógeno relacionados à virulência em infecções mamárias em vacas, tampouco com a gravidade clínica dos casos. Neste cenário, o presente estudo investigou 18 genes associados com *E. coli* extraentérica (ExPEC), o perfil “in vitro” de motilidade *swimming* e *swarming*, e a sensibilidade/resistência aos antimicrobianos em 114 isolados de *E. coli* obtidos de vacas com mastite clínica com escores de gravidade 1 (45/114=39,5%), 2 (62/114=54,4%) e 3 (7/114=6,1%). Os principais genes codificadores de FV detectados foram de adesinas (*fimH*, 114/114=100%; *ecpA*, 73/114=64,0%; *fimA*, 36/114=31,6%), resistência ao soro (*traT*, 93/114=81,6%; *ompT*, 40/114=35,1%), sideróforos (*irp2*, 11/114=9,6%) e hemolisina (*hlyA*, 8/114=7%). Os isolados apresentaram 99,1% (113/114) de resistência *in vitro* a bacitracina e cloxacilina, 98,2% (112/114) a lincosamina e 54,4% (62/114) a eritromicina. Do total de isolados, 98,2% (n=112/114) foram multirresistentes pelo cálculo do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA). Não houve diferença estatística significativa entre as medianas para motilidade *swimming* (13,8 mm) e *swarming* (13,5 mm), bem como para os níveis de gravidade clínica e os genes investigados. A presença de isolados multirresistentes aos antimicrobianos reforça a necessidade do uso racional destes fármacos no tratamento e profilaxia da mastite bovina. A alta frequência de detecção nos isolados dos genes relacionados a resistência ao soro (*traT*, *ompT*) e adesão (*ecpA*); bem como a maior frequência das associações entre os genes *fimH*, *ecpA* e *traT* em vacas com escore 1 (7/45=15%) e 2 (14/62=22,6%) sugerem que os genes *traT*, *ecpA* e *ompT* poderiam servir como biomarcadores de ExPEC em infecções mamárias

clínicas em vacas. No entanto, a não significância estatística deste achado indica que outros mecanismos de virulência e fatores ligados a vaca possam estar envolvidos na ocorrência e gravidade clínica da mastite bovina. Na literatura consultada, os genes associados com ExPEC de resistência ao soro *ompT*, da invasina *ibe10* e da adesina *ecpA* foram investigados pela primeira vez em casos de mastite em vacas nos quais os escores de gravidade clínica foram investigados.

Palavras-chave: mastite ambiental, ExPEC, mecanismos de virulência, multirresistência bacteriana.

GUERRA, S. T. **Antimicrobial resistance and virulence of *E. coli* strains isolated from bovine mastitis with different clinical scores**. Botucatu, 2019, 101p. School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Botucatu, Sao Paulo State University – UNESP.

ABSTRACT

Escherichia coli is the major pathogen involved in the etiology of bovine mastitis from the environment origin. This pathogen is characterized by a complexity of virulence factors (VF). Mammary infections by *E. coli* has shown a wide range of clinical signs causing changes in milk (score 1 or mild), quarters (score 2 or moderate), and systemic signs (score 3 or severe). Nevertheless, to date, the profile of the genes related to the virulence of this pathogen in mammary infections and the severity scores of the cases are not fully understood. In this scenario, a panel of 18 genes associated with extra-intestinal *E. coli* (ExPEC) were investigated, in addition to *in vitro* swimming and swarming motility profile, and antimicrobial susceptibility/resistance pattern among 114 *E. coli* strains isolated from cows with clinical mastitis showing severity scores 1 (45/114=39.5%), 2 (62/114=54.4%) and 3 (n=7/114=6.1%). The main genes related to VF harbored by isolates were adhesins (*fimH*, 114/114=100%; *ecpA*, 73/114=64.0%; *fimA*, 36/114=31.6%), serum resistance (*traT*, 93/114=81.6%; *ompT*, 40/114=35.1%), siderophores (*irp2*, 11/114=9.6%) and hemolysin (*hlyA*, 8/114=7%). Among studied isolates, 99.1% (113/114) showed *in vitro* resistance to bacitracin and cloxacillin, 98.2% (112/114) to lincosamin, and 54.4% (62/114) to erythromycin. Out of the total isolates, 98.2% (112/114) were considered multidrug resistant based on multiple antimicrobial resistance (MAR) index. No statistical difference was observed between swimming (13.8mm) and swarming (13.5mm) motility assays, as well as severity scores of clinical mastitis, and the ExPEC associated genes studied. The multidrug resistance of the isolates highlights the need for responsible use of antimicrobials on therapy and control of bovine mastitis. The high frequencies among isolates of the genes related to serum resistance (*traT*, *ompT*) and adhesion of the pathogen (*ecpA*), in addition to main associations between the genes *fimH*, *ecpA* e *traT* among cows with severity scores 1 (7/45=15%) and 2 (14/62=22.6%), is a circumstantial evidence that the genes *traT*, *ecpA* e *ompT* may be used as biomarkers of ExPEC among

clinical mammary infections in cows. Nevertheless, the lack of statistical significance between the genes studied and clinical scores indicates that other virulence properties or factors intimately related to cows might be involved in clinical bovine mastitis and severity of cases. In addition, the genes related to ExPEC *ompT* (serum resistance), *ibe10* (invasins), and *ecpA* (adhesin) were investigated by first time among cows with mastitis where scores of clinical severity were assessed.

Key-words: environmental mastitis, ExPEC, mechanisms of virulence, multidrug resistance

1. INTRODUÇÃO

A mastite é definida como inflamação da glândula mamária, caracterizada pela complexidade etiológica, predominantemente bacteriana, causando infecções clínicas e subclínicas (RUEGG, 2017). A mastite clínica bovina é manifestada por alterações no leite e/ou no quarto mamário e ocasionalmente, por sinais sistêmicos (WENZ et al., 2001; ROBERSON, 2012).

Os casos clínicos são causados principalmente por micro-organismos de origem ambiental como as enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Proteus* sp.) e estreptococos (*Streptococcus uberis*). Os patógenos ambientais são, na maioria dos casos, oportunistas que invadem a glândula mamária e, por não serem adaptados ao hospedeiro, provocam processos inflamatórios com sinais clínicos com duração de poucas semanas (BRADLEY, 2002).

Escherichia coli (*E. coli*) é um dos agentes causais mais comuns de mastite clínica em vacas, de origem ambiental. A gravidade dos quadros clínicos de mastite bovina por *E. coli* tem sido classificada, convencionalmente, em três níveis ou escores: leve (grau 1), moderado (grau 2) e grave (grau 3). Nos casos grau 1 observam-se alterações exclusivamente no leite dos quartos afetados. Os casos grau 2 apresentam, além de alterações visíveis no leite, sinais de inflamação na glândula mamária. Nos casos grau 3, além dos sinais no leite e glândula mamária, ocorre comprometimento sistêmico do animal, com risco de óbito por choque endotóxico e/ou hipovolêmico (WENZ, 2001; PINZÓN-SÁNCHEZ; RUEGG, 2011).

E. coli pertence a microbiota entérica de animais e humanos. É encontrada amplamente no ambiente dos criatórios dos animais. Caracteriza-se por pluralidade de fatores de virulência (FV), incluindo fatores intrínsecos (presentes na constituição da parede bacteriana) e extrínsecos como fímbrias, adesinas, citotoxinas, mecanismos de captação de ferro exógeno e enterotoxinas. A ação conjunta desses FV está relacionada a afecções entéricas e diversas manifestações extraentéricas (BLUM et al., 2008; MAINIL, 2013).

A identificação dos diferentes FV de *E. coli* isoladas de mastite tem sido objeto de estudo em vários países (BLUM; LEITNER, 2013; LIU et al., 2014). No entanto, não está totalmente esclarecido o perfil de genes e FV associados a mastite clínica ou subclínica em vacas (LEIMBACH et al., 2017), tampouco com

35 os níveis de gravidade clínica dos casos (SUOJALA et al., 2011). Ademais, a
36 maioria dos estudos têm sido conduzidos com FV diarreioogênicos (CORREA;
37 MARIN, 2002; WENZ et al., 2006), que provavelmente exercem pouca ou
38 nenhuma influência nos casos de mastite bovina.

39 A motilidade bacteriana é outro fator de virulência estudado em isolados de
40 *E. coli*. A presença de motilidade bacteriana dos tipos *swimming* e *swarming* foi
41 relacionada à maior patogenicidade e persistência dos isolados de *E. coli* na
42 glândula mamária. Contudo, ainda não está totalmente esclarecida a influência
43 destes tipos de motilidade bacteriana na gravidade clínica dos casos de mastite
44 bovina (LIPPOLIS et al., 2014).

45 O uso indiscriminado de antimicrobianos em animais domésticos é apontado
46 como uma das principais causas da emergência de bactérias multirresistentes
47 (ECONOMOU; GOUSIA, 2015; VAN BOECKEL et al., 2015). A utilização de
48 antimicrobianos no momento da secagem de vacas (para o tratamento de
49 infecções subclínicas na lactação e na prevenção de novas infecções) é o único
50 procedimento de uso profilático de fármacos ainda permitido em animais de
51 produção. Esta prática tem sido questionada (SUOJALA; KAARTINEN;
52 PYÖRÄLÄ, 2013) e até mesmo proibida em alguns países pelo risco de
53 aumentar a pressão seletiva para bactérias multirresistentes (VILAR et al., 2018).

54 Diante do exposto, permanece não totalmente esclarecido o perfil dos
55 diferentes FV nas infecções mamárias por *E. coli* em vacas, notadamente em
56 linhagens ExPEC, bem como o estabelecimento da relevância da motilidade dos
57 isolados em relação a gravidade clínica dos casos. Neste contexto, o presente
58 estudo investigou o perfil genotípico de diferentes FV em *E. coli* isolados de
59 mastite clínica em vacas com diferentes níveis de gravidade clínica, com ênfase
60 em mecanismos de virulência relacionados a ExPEC, bem como a motilidade
61 bacteriana e o perfil de sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos.

62

63 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

64 2.1 Leite no Brasil

65 O leite é considerado um dos mais nobres produtos de origem animal e,
66 devido as suas características nutritivas, é indispensável na alimentação
67 humana. O leite e seus derivados são fontes de proteínas, gorduras,
68 carboidratos, sais minerais e vitaminas. O Ministério da Saúde do Brasil