

JOSÉ BENEDITO CARVALHO FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE
Escherichia coli DE MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F363c
2008

Fernandes, José Benedito Carvalho, 1966-
Caracterização de fatores de virulência em isolados de
Escherichia coli de mastite bovina / José Benedito
Carvalho Fernandes – Viçosa, MG, 2008.
xi, 57f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 47-57

1. Bovino – Doenças. 2. Mastite. 3. Bactérias
patogênicas. 4. Virulência (Microbiologia) I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.2089692

JOSÉ BENEDITO CARVALHO FERNANDES

**CARACTERIZAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE
Escherichia coli DE MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de dezembro de 2008.

Prof. Paulo Sérgio de Arruda Pinto

Prof. José Dantas Ribeiro Filho

Prof^a Márcia Rogéria de Almeida

Dr^a Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Prof. Luís Augusto Nero
Presidente da Banca

*A Deus.
A meus pais Maria e Benedito.
À minha esposa Juliana.
Àqueles que virão.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão de tudo e todos, que através de seus desígnios me colocou nesta instigante e com certeza, profícua empreitada.

Aos meus pais, sustentáculos de todo esse processo, veículos da inspiração divina que se faz presente neste experimento, em especial a minha mãezinha que acompanhou os primeiros passos desse trabalho e que presenciará o seu desfecho junto do Criador - Saudades!!

À Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, pela orientação, paciência, exemplo e principalmente, pela confiança em me ceder esse espaço, além de ter apostado e estimulado o andamento deste trabalho, e principalmente aguardar ansiosa pelo seu desfecho!

À minha incansável e comprometida esposa Juliana, que me incentivou nos momentos mais difíceis e soube suportar e aceitar minha ausência. Saiba que a certeza de que vamos colher frutos desta empreitada é o meu alimento!

Aos estagiários e amigos Larissa, Newton e Isabel, pela dedicação, companheirismo e enriquecedor convívio, seja no laboratório ou distante dele, em ambientes regados a piadinhas “Newtonianas” e extensas gargalhadas “Isabelianas”.

À Professora Célia Moraes e Professora Márcia Rogéria, por terem gentilmente aberto as portas de seus laboratórios no BIOAGRO para que eu realizasse parte dos experimentos. E ao Professor Patarroyo, que atestou a confecção de meu cartão de identificação para que pudesse adentrar em horas “escusas” no mesmo BIOAGRO.

Ao Professor Domingos, pelo incentivo, troca de idéias, por ter aberto espaço em seu laboratório na Unicamp e ter me auxiliado, mesmo a distância.

Ao Professor Tomomasa Yano - um grande entendedor do conteúdo desta dissertação, por ter nos cedido a maioria dos controles utilizados.

Ao Professor Abelardo, por todo o auxílio, incentivo e sugestões.

À Professora Rosa Maria Silva, Unifesp, Campinas, por ter cedido mais um isolado de *E. coli* para ser utilizado como controle neste experimento.

Ao Professor Nero e à Professora Paula, pelo auxílio, sugestões e por todo o apoio durante a ausência da Professora Cida.

À colega Ana Carolina, Unicamp, que mesmo a distância foi uma grande incentivadora e teve participações decisivas em certas fases deste experimento.

Aos funcionários do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da UFV, principalmente ao Luiz Carlos e ao Marquinhos, por toda dedicação e disponibilidade em todos os momentos em que precisei.

À Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco, na pessoa da Dra. Maria Aparecida, que gentilmente cedeu à maioria dos isolados de *E. coli* deste experimento.

A toda a minha família, que, de forma uníssona, me cobrou e incentivou.

À Rosi, pelo apoio burocrático durante todo o curso de mestrado, principalmente no período próximo à defesa.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Veterinária e ao BIOAGRO pela oportunidade profissional.

E a todos os que contribuíram com seus conhecimentos e experiências para a realização desse sonho.

Que Deus vos abençoe!

BIOGRAFIA

JOSÉ BENEDITO CARVALHO FERNANDES, filho de Benedito Alves Fernandes e Maria Antonieta Carvalho Fernandes (*in memoriam*), nasceu em 03 de agosto de 1966, na cidade de Caxambu, estado de Minas Gerais.

Em março de 1987, iniciou o curso de Farmácia e Bioquímica na Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, finalizando-o em dezembro de 1990.

Em janeiro de 1991, ingressou no Programa de Residência em Análises Clínicas no Laboratório Central – Hospital Universitário (UFJF), por dois anos, tendo recebido o Título de Especialista em Análises Clínicas.

Fez parte do Quadro de Oficiais Bioquímicos Temporários do Exército Brasileiro de janeiro de 1993 até abril de 1996, tendo atuado junto ao Laboratório de Análises Clínicas (LAC), do Hospital Geral do Exército, em Juiz de Fora.

Atua no mercado privado de Análises Clínicas de Viçosa desde 1996, sendo atualmente proprietário da empresa Hemolab Análises Clínicas, junto ao Hospital São Sebastião. Participante da Comissão de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH) deste nosocômio como Microbiologista.

Ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, sob orientação da Professora Dra. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira no primeiro semestre letivo do ano de 2006 e em dezembro de 2008 submeteu-se ao exame final de defesa de tese.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Culturas bacterianas.....	17
4.2. Produção de toxinas e de fatores citotóxicos de necrose (FCN)	18
4.3. Produção de hemolisinas	19
4.4. Teste de resistência aos antimicrobianos.....	20
4.5. Resistência ao soro	22
4.6. Produção de biofilmes	23
4.7. Pesquisa do antígeno capsular K1	24
4.8. Caracterização genotípica – Reação em cadeia de polimerase (PCR) .	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. Produção de toxinas e de fatores citotóxicos de necrose.....	26
5.2. Pesquisa de hemolisinas	32
5.3. Resistência aos antimicrobianos	34
5.4. Resistência ao soro	37
5.5. Produção de biofilmes	40
5.6. Pesquisa do antígeno capsular K-1	41
5.7. Caracterização genotípica	43
5. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Monocamada de células Vero intactas, sem adição de filtrado bacteriano (Controle negativo). 400X..... 30
- Figura 2. Monocamada de células Vero após 24h de incubação com adição do filtrado bacteriano de *E. coli* 3E Efeito citotóxico ausente. 400X..... 30
- Figura 3. Monocamada de células Vero após 48h de incubação com adição do filtrado bacteriano de *E. coli* 3E. Efeito citotóxico: alongamento e morte celular inicial. 400X. 30
- Figura 4. Monocamada de células Vero após 72h de incubação com adição do filtrado bacteriano de *E. coli* 3E. Efeito citotóxico: morte celular (células dispersas no meio). 400X 30
- Figura 5. Monocamada de células Vero após 48h, incubação com adição do filtrado bacteriano de *E. coli* 25. Efeito citotóxico: arredondamento compatível com verotoxina. 400X. 30
- Figura 6. Monocamada de células Vero após 48h de incubação com adição do filtrado bacteriano, *E. coli* 3888. Efeito citotóxico: arredondamento compatível com verotoxina. 400X. 30
- Figura 7. Ação de α -hemolisina (seta preta) produzida pela *Escherichia coli* FVL-16 (controle positivo).em Agar Sangue 5% após 3h de incubação a 37°C. 33
- Figura 8. Ações de enterohemolisina (seta branca) produzida pela *Escherichia coli* C3888 (controle positivo) e de α -hemolisina (seta preta) produzidas pela *Escherichia coli* FVL-16 (controle positivo) após 24h de incubação a 37°C 33
- Figura 9. Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Ágar Muller Hinton. Controle de medida dos halos..... 35
- Figura 10. Isolado de *Escherichia coli* 30 em Ágar Muller Hinton apresentando perfil de resistência à Ampicilina e ao Sulfadiatrim, simultaneamente. 35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas nos estudos como controles positivos de diferentes fatores de virulência e suas origens.	18
Quadro 2. Antimicrobianos, marcas, concentrações e interpretações de zonas de inibição para avaliação de padrões de sensibilidade de microrganismos.....	21
Quadro 3. Marcadores de virulência de <i>Escherichia coli</i> , suas funções, local onde são codificados e patotipos que os expressam com mais freqüência	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de resultados de isolados de <i>Escherichia coli</i> em ensaios de citotoxicidade em células Vero	27
Tabela 2. Caracterização genotípica, realizada por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), dos isolados de <i>Escherichia coli</i> testados frente a fatores de colonização, toxinas, marcadores extraintestinais e outros mais relacionados com agentes da mastite	29
Tabela 3. Combinações de marcadores de virulência detectados em isolados de <i>Escherichia coli</i> obtidos de leite mastítico	31
Tabela 4. Perfil de resistência dos isolados de <i>Escherichia coli</i> encontrado frente aos antimicrobianos testados.....	35
Tabela 5. Valores de absorvância definindo o perfil de resistência dos isolados de <i>Escherichia coli</i> encontrado frente ao soro tratado.	39
Tabela 6. Valores de absorvância definindo o perfil de resistência dos isolados de <i>Escherichia coli</i> encontrado frente ao soro não tratado.	40
Tabela 7. Resultados gerais da detecção dos fatores de virulência de isolados de <i>Escherichia coli</i> obtidos de leite mastítico, por testes fenotípicos	43

RESUMO

FERNANDES, José Benedito Carvalho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2008. **Caracterização de fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* de mastite bovina.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-Orientadores: Paula Dias Bevilacqua e Luís Augusto Nero.

Escherichia coli é um microrganismo Gram-negativo pertencente ao grupo dos coliformes, e potencial agente causador de mastites em bovinos. A bactéria pode possuir diferentes fatores de virulência e esses são definidos como estruturas, produtos ou estratégias que contribuem para a bactéria aumentar sua capacidade em causar infecção. O presente estudo tem como objetivo investigar a presença destes fatores em isolados de *E. coli* obtidos de casos de mastite clínica, interrelacioná-los e estabelecer provável ligação com a infecção clínica. Vinte e sete culturas de *E. coli* isoladas de mastites bovinas clínicas foram caracterizadas quanto a diferentes fatores de virulência por análises fenotípicas e genotípicas. Todos os isolados apresentaram produção de biofilmes em diferentes níveis, além de 96,2% apresentarem resistência ao soro, 33,3% resistência aos antimicrobianos e 7,4% produção de verotoxinas. Nenhum dos isolados apresentou positividade para expressão de hemolisinas e antígeno capsular K1. A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase – PCR foi usada para detectar a presença de marcadores genéticos de virulência. Verificou-se presença de fatores de colonização do tipo 1 em 100% dos isolados e Cs31A em 29,6%. Quanto às toxinas, verificou-se a presença de genes para enterotoxina termo-estável em 55,6%, enterotoxina EAST-1 em 11,1% e verotoxina 2 em 7,4%. Ainda, foram detectados marcadores fimbriais para Pap em 7,4%, aer em 3,7% e kps em 3,7%. Todos os isolados que apresentaram gene para verotoxina 2 também apresentaram positividade na avaliação fenotípica. A análise filogenética demonstrou que os isolados pertencem aos grupos A (85%) e B₁ (15%), tipicamente relacionados a cepas

comensais, naturalmente presentes no meio ambiente. Esses resultados sugerem que os isolados de *E. coli* caracterizados nesse estudo são patógenos oportunistas, apresentando diferentes fatores de virulência, sem evidências de correlação entre eles.

ABSTRACT

FERNANDES, José Benedito Carvalho, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2008. **Characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis.** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-Advisers: Paula Dias Bevilacqua and Luís Augusto Nero.

Escherichia coli is a potential causative agent of bovine mastitis, which can present different virulence factors and, thus, be grouped in different pathotypes. The present study aims at investigating the presence of these factors in isolates of *E. coli* from clinical mastitis cases, interrelating them and establishing a probable connection with the clinical infection. Twenty-seven clinical bovine mastitis *E. coli* cultures were characterized due to the different virulence factors of phenotypical and genotypical analysis. All the isolates presented biofilms production in different levels, 96,2% presented resistance to the serum, 33,3% resistance to the antimicrobials, and 7,4% verotoxins production. None of the isolates was positive to haemolysins and capsular antigen K1. The PCR was used to detect the presence of genetic markers of virulence. It was possible to verify presence of type1 Fimbria in 100% of the isolates and Cs31A in 29,3%. Concerning the toxins, it was verified the presence of gens to thermostable enterotoxin in 55,6%, EAST-1 enterotoxin in 11,1%, and verotoxin 2 in 7,4%. Yet, fimbrial markers to Pap were detected in 7,4%, aer in 3,7% and kps in 3,7%. The isolates that presented gen to verotoxin 2 also presented positivity in the phenotypical evaluation. The phylogenetic analysis demonstrated that the isolates belong to groups A (85%) and B1 (15%), related to comensal strains, revealing the necessity of studies that can clarify the adaptability of these isolates to the mammary glands. These results suggest that the *E. coli* isolates characterized in this study are opportunist pathogens presenting different virulence factors, without correlation evidence among them.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os aspectos sanitários, a mastite é reconhecidamente uma das principais doenças que afetam a bovinocultura destinada à exploração leiteira. A doença resulta em prejuízos econômicos ao produtor, como também perigos aos consumidores do ponto de vista da Saúde Pública, uma vez que o leite e seus derivados podem se tornar potenciais veículos de transmissão de patógenos e toxinas.

No Brasil, cerca de 80% das vacas em produção leiteira apresentam no mínimo um quarto mamário acometido por mastite. Esta enfermidade varia entre a forma subclínica, onde os sinais de inflamação não são visualizados macroscopicamente, e a forma clínica, que possui diferentes níveis de comprometimento e pode determinar a morte do animal. Algumas cepas patogênicas de *Escherichia coli* são frequentemente associadas a casos de mastite bovina, principalmente em sua forma clínica. *E. coli* é um microrganismo de origem ambiental altamente adaptativo, existindo como comensal e patogênico. Sua habilidade de adquirir DNA exógeno, incluindo genes de virulência, é conhecida, o que contribui para o desenvolvimento de cepas patogênicas adaptadas à glândula mamária e potencialmente causadoras de mastites.

Vários estudos têm buscado a investigação de fatores de virulência em culturas de *E. coli* isoladas de leite bovino objetivando formar grupos baseados nesses fatores, que podem estar relacionados com o desenvolvimento da mastite. O conhecimento detalhado de características fenotípicas e moleculares desse importante agente etiológico da mastite bovina é fundamental para a adoção de medidas preventivas que busquem reduzir sua incidência e prevalência nos animais e no ambiente, além de definir seus perfis epidemiológicos e patológicos.

Considerando o exposto, este trabalho propõe identificar e caracterizar em isolados de *E. coli* obtidas de mastite quanto à presença e expressão dos seguintes fatores de virulência: toxinas, fatores citotóxicos de necrose, hemolisinas, resistência aos antimicrobianos, fatores de colonização, marcadores extraintestinais e outros, produção de biofilmes, antígeno capsular K1 e resistência ao soro, além de classificação em grupos filogenéticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Por mais de meio século após ter sido descoberta, *Escherichia coli* foi considerado como o maior comensal nas fezes e possuidor de baixa virulência. Esta visão mudou progressivamente com o reconhecimento da complexidade da microbiota fecal e da variedade de infecções superficiais similares às infecções intestinais causadas por *E. coli*. À identificação de uma larga variedade de fatores de virulência específicos, seguiu-se a definição da base individual de doenças. Deste modo, *E. coli* é considerado como um dos patógenos mais virulentos desde a sua descoberta (SUSSMAN, 1997).

E. coli apresenta-se como um bacilo Gram-negativo, curto e reto, não esporulado, usualmente móvel devido à presença de flagelos peritríquios. Frequentemente apresentam fímbrias e ocorrem isolados ou aos pares em crescimentos de culturas em meios líquidos. A cápsula ou microcápsula pode estar presente e algumas linhagens a produzem como uma profusa e viscosa camada polissacarídica. É um anaeróbio facultativo, capaz de se desenvolver por metabolismo fermentativo. Possui temperatura ótima de crescimento a 37°C em uma grande variedade de meios de cultura (SUSSMAN, 1997).

A classificação sorológica de *E. coli* depende de um número de antígenos: *i*) Lipopolissacáride somático (antígeno O); *ii*) capsular (antígeno K); *iii*) flagelar (antígeno H) e o fimbrial (antígeno F). Os três primeiros formam a base do esquema típico introduzido por Kauffmann (1944), que foi desde então ampliado (GROSS e ROWE, 1985) para inclusão da análise fimbrial (PARRY *et al.*, 1982; ØRSKOV e ØRSKOV, 1983). Mais de 700 sorotipos antigênicos de *E. coli* estão identificados baseados em seus antígenos O, H e K (KAPER *et al.*, 2004). Em contraste com cepas enteropatogênicas que se agrupam em número restrito de sorotipos, as oriundas de mastite causada por coliformes pertencem a um grande número de grupos sorológicos (BURVENICH *et al.*, 2003). Ainda que a função dos antígenos somáticos não esteja completamente

determinada, tem-se assumido que algumas cepas de *E. coli* que possuem determinados grupos O apresentariam vantagens no carreamento de material genético relacionado à codificação de determinados fatores de virulência, incluindo a produção de toxinas (EVANS *et al.*, 1977).

Cepas patogênicas de *E. coli* causadoras de várias infecções severas em animais e humanos (BEAN *et al.*, 2004) são classificadas em duas principais categorias: as entéricas e as extra-intestinais (KUHNERT *et al.*, 2000). *E. coli* entéricas são agrupadas em: *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), *E. coli* enteropatogênicas clássica (EPEC), *E. coli* produtoras de shiga toxina ou enterohemorrágicas (STEC ou EHEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enteroagregativas (EAaggEC) e a *E. coli* aderentes e difusas (DAEC). *E. coli* patogênicas extra-intestinais são genericamente chamadas ExPEC, e englobam principalmente *E. coli* uropatogênicas (UPEC) e *E. coli* causadoras de meningite neonatal (NMEC). Todas estas *E. coli* são agrupadas basicamente pela produção de fatores de virulência que conseqüentemente manifestam-se nos sinais clínicos no homem e nos animais (GYLES, 1992).

Fatores de virulência são definidos como estruturas, produtos ou estratégias que contribuem para a bactéria aumentar sua capacidade em causar infecção (TRABULSI, 2005). Alguns fatores de virulência estão mais envolvidos com a colonização (adesinas e invasinas) e outros com as lesões ao hospedeiro (toxinas).

Adesão é a estratégia que as bactérias usam para se fixar nas células e nos tecidos do organismo. A capacidade de aderir de maneira firme é mediada por finos filamentos de natureza protéica, que se projetam da superfície bacteriana, denominados fatores de colonização, fímbrias, *pili* ou definidas coletivamente como adesinas. Este mecanismo de adesão permite a liberação de diferentes toxinas do agente para o interior celular, a invasão destas células e/ou a disseminação sistêmica pelo hospedeiro (GYLES, 1992; SUSSMAN, 1997).

Muitas bactérias que causam doenças têm a capacidade para penetrar no interior da célula do hospedeiro, em outra importante estratégia denominada invasão. Basicamente, penetram nas células do organismo por um processo natural de fagocitose, se for exercida por fagócitos e ajudada por anticorpos e Sistema Complemento. A invasão pode ocorrer de forma ativa, por um

processo induzido pela bactéria quando envolve outras células não fagocitárias e dependente de diferentes proteínas chamadas de invasinas, que podem estar localizadas na membrana externa da bactéria ou serem injetadas no seu citosol (TRABULSI, 2005).

Certas linhagens de *E. coli* isoladas de mastites clínicas demonstram habilidade para aderir e invadir células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T cells) *in vitro*, em processo dependente do inóculo, tempo e fatores relacionados ao agente (DOPFER *et al.*, 2000).

A ocorrência das diferentes apresentações clínicas depende de propriedades ou fatores de virulência, que determinam o grau de patogenicidade do agente. Alguns destes fatores são componentes intrínsecos da estrutura bacteriana, também denominados endotoxinas (CASTRO e YANO, 1992). Outros, porém, constituem-se de diferentes tipos de exotoxinas (enterotoxinas, verotoxinas, hemolisinas e Fatores Citolíticos de Necrose), bem como propriedades que permitem a multiplicação em meio com restrição de ferro ou a multiresistência aos antimicrobianos (GYLES, 1992; SUSSMAN, 1997; TRABULSI, 2005).

Embora os métodos fenotípicos demonstrem a presença de fatores de virulência, em condições de laboratório, geralmente os genes que codificam esses fatores não são expressos ou se são, em níveis baixos. Estes genes são fortemente regulados por uma variedade de fatores, os quais *in vitro* podem inibir suas expressões, dificultando sua detecção fenotípica (KUHNERT *et al.*, 2000). A biologia molecular tem facilitado o estudo dos fatores de virulência em bactérias com base na detecção de seus respectivos genes (PASS *et al.*, 2000).

O papel da *E. coli* como agente causal em um número de doenças pode não estar bem elucidado, mas os diversos estudos científicos indicam que somente alguns sorogrupos estão associados com cada tipo de infecção (SUSSMAN, 1997). Alguns desses grupos são importantes causadores da mastite bovina, que é uma das mais complexas e dispendiosas doenças da indústria leiteira devido a sua alta prevalência e os prejuízos que acarreta. Este quadro traduz sua gravidade quando se observa que a doença pode promover perdas de até 70% da produção, além de descarte do leite, gastos com medicamentos e assistência veterinária, mortes e descarte do animal, o que

significa também perda de material genético (COSTA, 2008). Além destas perdas, há ainda um risco potencial à Saúde Pública, já que pode promover a veiculação de patógenos causadores de zoonoses e de toxinfecções alimentares (WELLS *et al.*, 1998; REED e GRIVETTI, 2000). Ainda, há a preocupação a nível social, por agravar problemas como desnutrição, mortalidade infantil, fome e quedas nos lucros pelo proprietário e conseqüentemente perda do seu poder aquisitivo (FONSECA e SANTOS, 2000).

A mastite causada por *E. coli* pode variar de uma simples inflamação local até severas alterações sistêmicas com atonia rumenal, desidratação, choque toxêmico resultando na morte do animal (WENZ *et al.*, 2006). As infecções por *E. coli* na glândula mamária estão relacionadas ao comportamento oportunista do agente, que é veiculado pelas fezes dos animais e chega pela via ascendente infectando o animal via canal do teto (EBERHART, 1979; RADOSTITS *et al.*, 2002).

Considerando um alto grau de versatilidade e adaptabilidade deste microrganismo, pode-se mencionar a existência de algumas cepas de *E. coli* altamente adaptadas, que têm adquirido específicos atributos de virulência e conferem uma maior habilidade de sobrevivência em novos nichos, o que permite a elas causar um largo espectro de doenças (KAPER e NATARO, 2004). Comparações entre os genomas de *E. coli* patogênicas e a *E. coli* K12 (não patogênica) revelam que o genoma da primeira contém aproximadamente 25% de DNA genômico a mais do que a não patogênica (KAPER e NATARO, 2004). Estes atributos de virulência são freqüentemente codificados por elementos genéticos que podem ser mobilizados entre diferentes isolados para criação de novas combinações de fatores de virulência, ou em elementos genéticos que podem ter sido móveis, mas passar a estar incorporados ao genoma. Somente as mais prósperas combinações de fatores de virulência persistem e se tornam verdadeiros e específicos patótipos de *E. coli* que seriam capazes de causar doenças em animais sadios (KAPER e NATARO, 2004).

Estudos fenotípicos dos fatores de virulência de culturas de *E. coli* isoladas de mastite bovina têm evidenciado a resistência à atividade bactericida do soro (FANG e PYÖRRALA, 1995) e presença do antígeno K1

(Nemeth et al., 1994), em contraste com a ausência de produção de enterotoxina termoestável 1 (ST1), termolábil (LT) e verotoxinas (SANCHEZ-CARLO *et al.*, 1984; VALENTE *et al.*, 1988; BARROW e HILL, 1989; HOGAN *et al.*, 1990). Dados semelhantes foram encontrados por Lipman *et al.* (1995), que detectaram em 55% de culturas de *E. coli* isoladas de leite mastítico gene relacionado com a fímbria F17, mas nenhum para enterotoxina LT, ST1, Fator citotóxico de necrose 2 (FCN 2) e verotoxina.

Barrow e Hill (1989) pesquisaram fatores de virulência em 237 culturas de *E. coli* isoladas de mastite na Grã-Bretanha, e observaram a produção de α -hemolisina, enterotoxina e verotoxina, respectivamente, em cinco, um e 0,5% dos isolados, e ainda relacionam a resistência a um ou mais antimicrobianos em 22% dos isolados, destacando os maiores índices para estreptomicina (18%), tetraciclina (15%), sulfonamida (15%) e ampicilina (14%). Índices semelhantes foram encontrados por Hogan *et al.* (1990), ao determinarem a produção de enterohemolisinas em 76 culturas de *E. coli* isoladas de mastite clínica bovina nos EUA e encontraram efeito hemolítico em 3,9 e 2,6% das culturas semeadas e ágar sangue preparado com hemácias de ovinos e bovinos, respectivamente.

E. coli pode ser caracterizada pela detecção dos fatores de virulência em testes fenotípicos e/ou pela presença dos genes de virulência em ensaios genotípicos (STUBER *et al.*, 2003). A identificação desses fatores fenotípicos e moleculares de culturas de *E. coli* isoladas de leite mastítico é importante no estudo de seus mecanismos de patogenicidade, além da epidemiologia da doença, contribuindo para o controle, profilaxia e tratamento da mastite.

Enterotoxinas termolábeis - LT

Gyles e Barnum (1969) identificaram uma enterotoxina célula-livre que foi associada com culturas de *E. coli* isoladas de quadros de diarreia em suínos, mas termolábeis e antigenicamente relacionadas com a toxina colérica produzida pela bactéria *Vibrio cholerae*.

Uma grande variedade de sorogrupos de ETEC de origem suína produzem LT do tipo 1 (LT1), sendo que muitos destes isolados possuem também a adesina fimbrial F4 (K88). Além dos suínos, a LT1 foi também

detectada em isolados obtidos de outros animais (HONDA *et al.*, 1981; GEARY *et al.*, 1982).

Outra enterotoxina termolábil, LT do tipo 2 (LT2), foi detectada em *E. coli* SA53 isoladas de fezes de búfalos na Tailândia. Embora compartilhe muitas propriedades biológicas com a LT1, não é neutralizada por antisoros contra toxina colérica ou LT1 (GREEN *et al.*, 1983; PICKETT *et al.*, 1986). A toxina causa arredondamento de células adrenais Y1 e CHO (células de ovário de Hamster chinês) assim como o aumento da atividade de Adenilato ciclase em células eucarióticas (GREEN *et al.*, 1983), mas, ao contrário da LT1, que é codificada por um plasmídeo, LT2 é cromossomicamente codificada (PICKETT *et al.*, 1986).

Fatores Citotóxicos de Necrose - FCN

FCN foram primeiramente descritos em isolados de *E. coli* originários de infecções extra-intestinais em humanos (CAPRIOLI *et al.*, 1983), e são caracterizados como substâncias termolábeis que causam a formação de células gigantes em células Vero, HeLa e CHO, e produzem necrose quando injetados intradermicamente em coelhos. Culturas de *E. coli* que produzem FCN têm sido freqüentemente isoladas de suínos, bovinos e cães (GONZÁLES e BLANCO, 1985; MACLAREN e WRAY, 1986; PRADA *et al.*, 1991; MAINIL *et al.*, 1999). Embora FCN tenham sido detectados em uma grande variedade de sorogrupos de *E. coli*, muitos isolados demonstram uma estreita relação com alguns grupos de antígenos O, a saber: O2, O4, O6, O22, O32, O75, O83 e O88 (HOLLAND, 1990).

FCN têm sido detectados em culturas de *E. coli* isoladas de bovinos com e sem diarreia (BLANCO *et al.*, 1993), e nos últimos anos, associados a casos de mastite (KAIPAINEN *et al.*, 2002). Esses fatores são de natureza protéica, com características bastante similares, porém com variação no seu local de codificação genética. FCN1, por exemplo, é cromossomicamente codificado (FALBO *et al.*, 1992), enquanto FCN2 é codificado pelo plasmídeo *Vir* (GYLES, 1992), primeiramente detectado por Smith (1974) e por Smith e Huggins (1976). Em relação ao mecanismo de patogenicidade, FNC2 difere de FCN1 na forma como causa necrose em ratos, além de levar a um moderado acúmulo

de fluido nas dobras intestinais do coelho e alongação de células HeLa (De RYCKE *et al.*, 1987; De RYCKE e PLASSIART, 1990).

Ambos os tipos de FCN são proteínas monoméricas de 110 a 115kDa (CAPRIOLI *et al.*, 1984; OSWALD e De RYCKE, 1990). Muitos isolados produtores de FCN1 também produzem uma hemolisina que é codificada pelos genes de FCN no fragmento 37-kb de DNA, característica não comum às cepas produtoras de FCN2 (CAPRIOLI *et al.*, 1987; BLANCO *et al.*, 1990; De RYCKE e PLASSIART, 1990). Pohl *et al.* (1993) sugerem que, ocorra subestimação do real envolvimento do FCN em afecções em animais, em virtude da grande maioria dos estudos investigarem os FCN somente em cepas hemolíticas de *E. coli*.

Verocitotoxinas - VT

Cepas de *E. coli* verotoxigênicas (VTEC) foram primeiramente descritas por Konowalchuk *et al.* (1977), devido à observação de seus filtrados causarem danos irreversíveis em Células Vero e HeLa. As toxinas responsáveis, verocitotoxinas (VT), possuem propriedades biológicas, físicas e antigênicas semelhantes às da Shiga toxina da *Shigella dysenteriae* (O'BRIEN *et al.*, 1982). Conseqüentemente, essas toxinas são também conhecidas como toxinas Shiga-like. O tipo de VT neutralizado por anti-Shiga toxina foi designado VT1. Um segundo tipo de toxina, primeiramente demonstrado em uma cepa de *E. coli* O157, não é neutralizado por anti-Shiga toxina e foi denominado VT2 (SCOTLAND *et al.*, 1985).

Culturas de VTEC isoladas de animais possuem uma grande variação de sorogrupos (SMITH *et al.*, 1988; HOLLAND, 1990), e são relacionados a diversas doenças em bovinos e suínos (HOLLAND, 1990), e isolados de casos de doença do Edema (DOBRESCU, 1983; SMITH *et al.*, 1983).

Hemolisinas

As hemolisinas de *E. coli* são investigadas comumente sob dois aspectos: *i*) suas propriedades biológicas e bioquímicas; e *ii*) sua importância

como fator de virulência em infecções por *E. coli* em humanos e animais (BEUTIN, 1991).

A habilidade de certos isolados de *E. coli* para lisar eritrócitos de diferentes espécies de mamíferos, foi primeiramente descrita por Kayser em 1903, notando que após a filtração, os sobrenadantes de culturas de *E. coli* possuíam atividade hemolítica, sugerindo que não estivessem ligadas às células bacterianas. Dudgeon e Pulvertaft (1927) também reportaram atividade hemolítica em culturas de *E. coli*, mas não puderam demonstrar hemolisinas em filtrado de culturas. Eles defendiam que toda atividade estava associada com a célula de *E. coli*.

Smith em 1963 foi o primeiro a diferenciar claramente hemolisinas em processo semelhante ao utilizado por Lovell e Rees (1960), demonstrando que sob certas condições de crescimento, alguns isolados hemolíticos de *E. coli* produziam hemolisinas livres e ligadas às células bacterianas, simultaneamente. Hemolisinas ligadas às bactérias não foram neutralizadas por antisoros preparados contra hemolisinas não ligadas, indicando que as duas hemolisinas poderiam ser diferentes (SMITH, 1963). Smith designou o fator hemolítico ligado à célula como β -hemolisina e o fator célula-livre como α -hemolisina.

Um novo tipo de hemolisina chamada enterohemolisina foi descrita a partir de isolados de *E. coli* originários de gastroenterites infantis (BEUTIN *et al.*, 1988). O termo enterohemolisina foi relacionado ao fato de se apresentarem a partir de alguns sorogrupos de EPEC (LEVINE, 1987). Entretanto, a produção de enterohemolisina foi mostrada ser associada com VTEC (BEUTIN *et al.*, 1991). Assim como β -hemolisina, a enterohemolisina se mostrou associada com as células bacterianas (BEUTIN, 1991).

A possível influência da composição do meio de crescimento na síntese e atividade da α -hemolisina foi discutida, e o Ca^{++} foi reportado ser essencial tanto para ativação (SNYDER e ZWADYK, 1969), para estabilidade (NICAUD *et al.*, 1985), quanto para favorecer a ligação da toxina na membrana do eritrócito (LUDWIG *et al.*, 1988). Em contrapartida, não se apresenta como essencial para atividade da enterohemolisina (BEUTIN, 1991).

Em contraste, a produção de enterohemolisinas pode ser detectada somente em placas de ágar sangue (BEUTIN *et al.*, 1988). A zona de lise é

geralmente menor e visualmente mais turva que a produzida por α -hemolisina. As hemolisinas são ainda diferenciadas pelo intervalo de tempo necessário para detecção da hemólise: α -hemólise já pode ser detectada após três horas de incubação (produzida na fase logarítmica), enquanto a enterohemolisina requer incubação “overnight” (produzida na fase estacionária) (BEUTIN *et al.*, 1988).

Em trabalhos com cepas hemolíticas de *E. coli* observou-se uma associação entre a ocorrência de produção de hemolisinas e a ocorrência de enterites (GREGORY, 1962) em suínos, assim como doenças de outros animais (SMITH e HALLS, 1967). Porém, não foi demonstrada uma relação direta do papel da hemolisina nestas doenças. A associação significativamente mais alta entre infecções extraintestinais com a microbiota normal, praticamente conduz ao consenso de que *E. coli* hemolíticas são mais relacionadas como agentes causais em doenças que isolados não hemolíticos. Assim, os estudos evoluíram na importância das hemolisinas como um fator de virulência (CAVALIERI, 1984; SUSSMAN, 1997; MAINIL, 1999; RIBEIRO, 2006).

Na espécie bovina, a produção de α -hemolisina por isolados de *E. coli* parece não estar diretamente associada à ocorrência de distúrbios entéricos. Estudos têm demonstrado a associação de linhagens de *E. coli* hemolíticas, isoladas de infecções extra-intestinais em bovinos, com a produção de determinados fatores de virulência, tais como FCN, resistência ao soro e adesinas fimbriais P (MAINIL *et al.*, 1999).

Estudos demonstraram alguns dos efeitos da α -hemolisina em células teciduais e propuseram seu possível papel na produção de doenças. Preparações parcialmente purificadas de α -hemolisina a partir de isolados humanos são citotóxicos para leucócitos humanos e para fibroblastos *in vitro* (CAVALIERI e SNYDER, 1982). Outros relatos do processo lítico das hemácias sugerem a liberação de ferro livre favorecendo o crescimento bacteriano (LINGGOOD, 1982; WAALWIJK, 1983). Estes dois efeitos, isto é, citotoxicidade e estimulação de crescimento, provavelmente sejam os mecanismos pelos quais a hemolisina contribui para o aumento da virulência de *E. coli* (CAVALIERI, 1984).

Com relação a genética das hemolisinas, plasmídeos contendo determinantes para hemolisinas já foram demonstrados antes (SMITH e HALLS, 1967). O mecanismo através do qual a α -hemolisina é produzida e excretada parece ter controle genético bastante complexo. Tecnologias de DNA recombinantes foram usadas para o entendimento na produção das hemolisinas e verificação do seu potencial papel na virulência de linhagens de *E. coli* hemolíticas (CAVALIERI, 1984).

Antígenos capsulares

Bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa à sua camada de mureína, composta basicamente por lipopolissacarídeos (LPS), que é o antígeno somático "O" dos tipos selvagens destas bactérias. Alguns anticorpos direcionados contra este antígeno geralmente aglutinam estas bactérias. Estudos sorológicos com *E. coli* realizados inicialmente por Kauffmann (1944) e Kauffmann (1954) e revisados por Ørskov *et al.* (1977) mostraram que a aglutinação de muitos isolados por antisoros-O homólogos ocorrem somente após aquecimento. Este efeito inibidor é devido à presença de antígenos distintos do antígeno O que estão presentes em um envelope extracelular, ou cápsula, que recobre o antígeno O do LPS.

A cápsula protege as bactérias patogênicas contra defesas não específicas do hospedeiro, mais especificamente a ação do Sistema Complemento e fagocitose. Assim, bactérias encapsuladas tendem a ser mais virulentas, e suas cápsulas consideradas fatores de virulência. Anticorpos K específicos, formados em uma fase recente da infecção, superam o efeito protetor das cápsulas, não sendo reconhecidas como estranhas pelo hospedeiro. Como resultado, anticorpos não são produzidos e o hospedeiro é vulnerável a esta cepa patogênica especificamente (SUSSMAN, 1997).

Resistência ao soro

A morte de bactérias Gram-negativas pelo complemento sérico é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro, e conseqüentemente a

resistência ao poder bactericida do soro é considerada como um determinante da patogenicidade bacteriana (TAYLOR, 1983).

O Sistema Complemento, maquinário central deste mecanismo de defesa, pode ser ativado através da via clássica (com a presença do anticorpo) ou através da via alternativa - C3 *shunt* (sem a presença do anticorpo). Ambas levarão à formação do complexo de ataque a membrana que rompe a membrana externa permitindo que a lisozima sérica degrade o peptidoglicano, que finalmente causa a bacteriolise (WRIGHT e LEVINE, 1981).

A resistência ao soro foi atribuída a vários fatores: LPS, antígeno capsular K1 (TAYLOR, 1983) e a presença de plasmídeos codificadores de proteínas de membrana externa como a TraT e a Iss (BINNS *et al.*, 1982). A proteína TraT é a maior proteína da membrana externa e se encontra em grande número de cópias na superfície celular bacteriana, e parece interferir com a opsonização ao complemento em sua ativação pela via alternativa, restringindo e alterando o sítio de ligação na membrana bacteriana pelo C3 (exclusão de superfície) e conseqüentemente inibindo a fagocitose (AGUERO *et al.*, 1984). A proteína Iss é codificada pelo gene *iss* (*increased serum survival*), que é responsável pelo bloqueio do complexo terminal do sistema do complemento que atua na membrana celular e causa a lise da célula. Portanto, ele confere à bactéria resistência ao Sistema Complemento (BINNS *et al.*, 1982).

Resistência aos antimicrobianos

Outra propriedade de virulência encontrada em isolados de *E. coli* é denominada fator de resistência aos antimicrobianos ou fator "R". Este fator pode ser transmitido a outros microrganismos da mesma espécie, favorecendo a manutenção de linhagens resistentes às diferentes drogas, dificultando conseqüentemente, tratamentos antimicrobianos para infecções desencadeadas por esses microrganismos (TRABULSI, 2005).

Ensaio de resistência microbiana *in vitro* em outros países têm demonstrado a resistência simples ou múltipla em cepas de *E. coli* isoladas de processos infecciosos nos animais, incluindo a espécie bovina (JOHNSTON *et al.*, 1983; RADOSTITIS *et al.*, 2002). Em seus estudos, Hinton (1986),

descreveu a presença de resistência em isolados de *E. coli* de mastite bovina, à pressão seletiva exercida pelo uso indevido de antimicrobianos na terapia de mastite, ou mesmo, no tratamento de outras afecções em bovinos. Linton *et al.* (1972) mencionam uma maior ocorrência de resistência aos antimicrobianos em linhagens de *E. coli* isoladas de pessoas provenientes de áreas rurais, que mantêm contato estreito com animais, comparativamente aos indivíduos provenientes de centros urbanos. Também ressaltaram o risco de veiculação de cepas de *E. coli* multi-resistentes para o homem, mediante o consumo de produtos e subprodutos de origem bovina, como o leite. Evidências adicionais, como as apontadas por Hirsch e Wiger (1978), se referem a isolados de *E. coli* de origem animal, adquiridas pelo homem por via oral, que podem transferir o fator R a isolados do mesmo microrganismo de origem humana.

Antibioticoterapia é o tratamento preconizado para mastite. O uso de antimicrobianos deve ser feito mediante os resultados apresentados pelo antibiograma, seguindo as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). O uso inadequado dos antimicrobianos pode promover a eliminação de resíduos de drogas no leite (responsáveis por quadros de anemia, distúrbios gastrointestinais e reações de hipersensibilidade no homem), interferir com a produção de subprodutos lácteos, ou mesmo favorecer a ocorrência de cepas multi-resistentes aos antimicrobianos convencionais (TAVARES, 1996; COSTA, 1999).

Biofilmes

A recidiva da mastite clínica causada por coliformes pode ocorrer por dois mecanismos: resultado de uma reinfecção ambiental ou como resultado da persistência do microrganismo dentro da glândula mamária (BRADLEY e GREEN, 2001). Lipman *et al.* (1994) observaram que a recidiva da mastite no mesmo quarto é causada pela mesma cepa de *E. coli*, o que não deveria ser comum, devido à grande diversidade de cepas desse microrganismo no ambiente. Assim, a reinfecção com a mesma cepa sugere a sobrevivência do microrganismo no hospedeiro resultado de uma infecção intramamária persistente. Dopfer *et al.* (1999) e Melchior *et al.* (2006) acreditam que as falhas na terapia da mastite podem ser atribuídas à capacidade de muitos

agentes etiológicos em produzir biofilmes nos tecidos lesados, e assim desenvolver uma resistência inata à maioria dos antimicrobianos e desinfetantes, driblando os mecanismos de defesas do hospedeiro.

Biofilme é uma comunidade estruturada de células bacterianas fechadas dentro de uma matriz polimérica produzida pelos próprios microrganismos e aderida a uma superfície viva ou inerte (COSTERTON *et al.*, 1999). Constitui um modo de proteção em ambientes hostis, e pode ter um papel importante na virulência da bactéria (van HOUTT e MICHIELS, 2005). Vários determinantes de superfície em *E. coli* são importantes na formação de biofilmes, como flagelos, fímbrias, *curli*, pili conjugativos, proteínas auto-transportadoras e produção de exopolissacarídeos (van HOUTT e MICHIELS, 2005). Estas observações indicam claramente a ocorrência de uma interação complexa entre o agente e o hospedeiro, e que a compreensão da cadeia envolvida na formação de biofilmes por *E. coli* pode elucidar seu poder de virulência (van HOUTT e MICHIELS, 2005).

A possibilidade de transmissão entre isolados de *E. coli* de material genético responsável pela síntese de fatores de virulência ligados a produção de toxinas, adesinas, hemolisinas, resistência ao poder bactericida do soro, cápsulas e resistência aos antimicrobianos, aliada à inconclusiva participação destes fatores na patogenia da mastite, têm despertado crescente interesse de pesquisadores para estudos focando a detecção de possíveis associações e/ou ocorrência simultânea destes fatores (SUSSMAN, 1997; RADOSTITIS *et al.*, 2002).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerando os prejuízos decorrentes da mastite, o aumento da prevalência de *E. coli* nos casos da doença, como também a importância do agente em Saúde Pública, o presente estudo tem como objetivo geral investigar a presença de fatores de virulência em isolados de *E. coli* obtidos de casos de mastite clínica, interrelacioná-los e estabelecer provável ligação com a infecção clínica.

Como objetivos específicos, o presente estudo procurou detectar fenotipicamente a produção de toxinas, fatores citotóxicos de necrose, hemolisinas, resistência a antimicrobianos, produção de biofilmes e antígeno capsular K1, assim como o poder de resistência ao soro; detectar a presença de genes associados a fatores de colonização, toxinas e hemolisinas e caracterizar os isolados em grupos filogenéticos previamente definidos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos seguintes laboratórios: *i*) Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC) e no *ii*) Laboratório de Virologia Animal (LVA), ambos pertencentes ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.1. Culturas bacterianas

Foram utilizadas 27 isolados de *E. coli* obtidos de amostras de leite mastítico, sendo seis pertencentes à bacterioteca do LDBAC e 21 pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da EMBRAPA - Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais. Cada isolado foi proveniente de um animal com mastite clínica.

Para confirmar a pureza e a identificação dos isolados foram realizados testes morfotintoriais e bioquímicos. Os resultados foram comparados com os do Manual de Bergey (SCHEUTZ e STROCKBINE, 2005).

Nos experimentos foram usadas cepas de referência de *E. coli* fornecidas gentilmente pelo Dr. Tomomasa Yano, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP e pela Dra. Rosa Maria Silva, Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo (Quadro 1). Todos os isolados foram armazenados em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid, Cambridge, Inglaterra) acrescidos de 20% de glicerol e estocados a – 86°C. No momento do uso, as culturas foram inoculadas em caldo BHI, incubadas a 37°C por 24h, e estriadas em ágar BHI, com incubação a 37°C por 24-48h. Após verificação de pureza das culturas, duas a três colônias isoladas eram transferidas para caldo BHI, incubadas a 37°C sob agitação em shaker a 150rpm até atingir uma

turbidez semelhante a escala 1 de MacFarland, valor correspondente a 3×10^8 Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL). A partir dessas culturas, diluições subseqüentes foram realizadas a fim de se atingir a concentração adequada para cada um dos experimentos descritos a seguir.

Quadro 1. Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas nos estudos como controles positivos de diferentes fatores de virulência e suas origens.

Linhagem	Marcador	Origem
<i>E. coli</i> O157: H7	Verotoxina tipo1(VT1)	Dr. J.M. Lord, University Warwick,UK
<i>E. coli</i> J2	Verotoxina tipo 2 (VT2)	Dr. Y. Takeda, Jiisen University, Japan
<i>E. coli</i> 40T	Toxina termolábil 1 (LT1)	L. R. Trabulsi, Instituto Butantã, SP, Brasil.
<i>E. coli</i> B62	Toxina termolábil 2 (LT2)	A. F. P. Castro, USP, SP, Brasil.
<i>E. coli</i> C3388	Enterohemolisina (EntHly)	L. Beutin, R. Koch Institute, Germany
<i>E. coli</i> MR48	Fator citotóxico de necrose 1 (FCN1)	J. Blanco, LREC*
<i>E. coli</i> FVL-16	FCN1 e α -hemolisina (α Hly)	J. Blanco, LREC
<i>E. coli</i> B26a	Fator citotóxico de necrose 2 (FCN2)	J. Blanco, LREC
<i>E. coli</i> J96	Resistência ao soro	Dra. Rosa Maria Silva, Unifesp, Campinas, SP, Brasil
<i>E. coli</i> ATCC25922	Resistência Bacteriana	American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA

* Laboratório-referência de *E. coli* da Faculdade de Veterinária, Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

4.2. Produção de toxinas e de fatores citotóxicos de necrose (FCN)

4.2.1. Obtenção do sobrenadante

Após cinco horas do início da recuperação das culturas a serem testadas, adicionou-se Mitomicina C (Bristol-Myers Squibb, Shizuoka, Japão) ao caldo BHI a fim de se obter uma concentração final de $1\mu\text{g/mL}$ e favorecer a produção do FCN, conforme Blanco *et al.* (1990). Ao término de 18 horas, as culturas foram centrifugadas a $10.000 \times g$, a 4°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana (Travi e Profilati di Pallanzeno - TPP, Brescia, Itália) com poro de tamanho de $0,22\mu\text{m}$ de diâmetro e estocados a -20°C em alíquotas de $500\mu\text{L}$.

4.2.2. Preparo das Culturas Celulares

Foram utilizadas células Vero (Rim de macacos verdes africanos) provenientes do LVA. As células estocadas à -86°C foram rapidamente descongeladas à temperatura ambiente, e em seguida transferidas para garrafas contendo Meio Essencial Mínimo (MEM) (Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab, Campinas, Brasil), Penicilina 1,6mg/L e Estreptomicina 0,4mg/L. Posteriormente, as garrafas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C por 48h, até a formação de uma monocamada celular homogênea.

Após 48h de incubação, foi realizado o descarte do meio de cultura e adicionado solução de tripsina salina (Sigma, Steinheim, Alemanha), com intuito de promover o deslocamento do tapete celular (tripsinização). Em seguida, as células foram novamente ressuspensas em MEM (Cultilab). Finalmente, 400µL esta suspensão de células foram distribuídas em microplacas contendo 24 orifícios e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C por mais 24h.

Após a formação da monocamada celular nas microplacas, foi adicionado em duplicata 50µL de filtrado acrescido de Mitomicina C nas seguintes diluições: 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 e 1/1.280 às culturas celulares. As alterações morfológicas foram analisadas após 24, 48 e 72 horas de incubação em microscópio óptico de luz invertida, como reportado por Yano *et al.* (1986). A formação de células gigantes e multinucleadas foi considerada compatível com a produção de FCN, enquanto que para a caracterização de isolados produtores de verotoxinas, foi considerado o efeito inicial de arredondamento e concomitante “enrugamento”, seguidos de perda da viabilidade celular. A produção de LT foi detectada pela presença de células com aparência alongada, apresentando espessamento da parede e filamentos dendríticos.

4.3. Produção de hemolisinas

Para detectar isolados de *E. coli* produtores de hemolisinas foi seguida a metodologia de Beutin *et al.* (1989).

4.3.1. Preparo da placa de Ágar sangue

O Ágar Trypticase de Soja (TSA, Difco, Lawrence, KS, EUA) foi autoclavado e mantido a uma temperatura de aproximadamente 50°C, para a manutenção da sua forma líquida. Em paralelo, cinco mL de sangue de carneiro desfibrinado foi lavado três vezes em solução tampão de Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,4, com centrifugações a 3.000 X g por cinco minutos, entre as lavadas. Após a lavagem final, foi ressuspenso em cinco mL de PBS e incorporado à 100mL de TSA. Concomitantemente foi acrescido 10mM de CaCl₂ (Merck, Rio de Janeiro, Brasil), homogeneizado e distribuído em placas de Petri previamente esterilizadas. Utilizou-se aproximadamente 12mL por placa.

4.3.2. Semeadura na forma de placa Mestra

Foi utilizada a semeadura na forma de placa mestra, usando 4µL da cultura previamente crescida em caldo BHI. Em seguida, as placas foram incubadas à 37°C e avaliadas após 3, 6, 18 e 24h.

Foram consideradas produtoras de α-hemolisinas os isolados que apresentaram hemólise entre três e seis horas com aumento progressivo do halo translúcido, hemólise total, ao longo das 24h de incubação. Os isolados que apresentaram hemólise parcial, entre 18 e 24h de incubação, foram consideradas produtoras de Enterohemolisinas.

4.4. Teste de resistência aos antimicrobianos

O teste de resistência aos antimicrobianos foi realizado segundo a metodologia de difusão com discos (Bauer *et al.* 1966), metodologia recomendada pelo FDA (Food and Drug Administration) e pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), utilizando-se antimicrobianos disponíveis comercialmente no país e prescritos no tratamento da mastite causada por *E. coli*, conforme mostrado no Quadro 2.

Quadro 2. Antimicrobianos, marcas, concentrações e interpretações de zonas de inibição para avaliação de padrões de sensibilidade de microrganismos.

Antimicrobianos	Concentração/ Disco (µg)	Diâmetro zona de inibição		
		Resistente	Intermediário	Sensível
Neomicina ^a	30	< 12	13 - 16	> 17
Gentamicina ^a	10	< 12	13 - 14	> 15
Cefoperazona ^b	75	< 15	16 - 20	> 21
Cefalexina ^a	30	< 14	15 - 17	> 18
Ceftiofur ^a	30	< 17	18 - 20	> 21
Ampicilina ^a	10	< 13	14 - 16	> 17
Florfenicol ^a	30	< 14	15 - 18	> 19
Sulfadiazina+trimetoprim (Sulfadiatrin) ^c	25	< 10	11 - 15	> 16

Marcas: (a) Cefar, SP, Brasil; (b) Oxoid, SP, Brasil; (c) CECON, SP, Brasil.

As culturas obtidas foram diluídas em escala seriada decimal até atingir a concentração estimada de 3×10^5 UFC/mL. Em seguida, com auxílio de um “swab” estéril, um alíquota da cultura foi espalhada sobre toda superfície das placas de Petri contendo 20mL de Ágar Müeller Hinton (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), para se obter um inóculo uniforme e homogêneo. Após dois minutos, discos de antimicrobianos foram posicionados na superfície do ágar em posições equidistantes, e as placas foram incubadas a 37°C por 18 horas. Todos os testes foram realizados em duplicata para cada isolado.

Para monitorar a precisão e acurácia dos procedimentos envolvidos, verificar a qualidade dos meios de cultura e dos antimicrobianos empregados foi utilizado a cepa padrão *E. coli* ATCC 25922 recomendada pelo CLSI.

Após incubação, os diâmetros dos halos de inibição de crescimento foram mensurados, e as médias entre as leituras das repetições foram consideradas como resultados finais. Para interpretação das medidas dos halos, foram considerados os padrões de resistência e sensibilidade para bactérias Gram-negativas do CLSI (Quadro 2).

4.5. Resistência ao soro

Para identificar os isolados de *E. coli* resistentes ao soro foi seguida a metodologia de Pelkonen *et al.* (1987), com modificações descritas a seguir. Foi obtido um “pool” de soros provenientes da coleta de sangue de 10 bovinos adultos, clinicamente saudáveis, totalizando 49mL de soro. Este “pool” foi dividido em sete alíquotas de sete mL e congelado a -86°C até o uso.

Foram obtidas três formas de soro a serem desafiados contra os isolados em análise: *i)* soro inativado, considerado sem atividade do complemento, obtido pela incubação por 30 minutos a 56°C; *ii)* soro tratado com a incorporação de Ácido etileno-glicol-tetra-acético, EGTA (Sigma, Steinheim, Alemanha) e Cloreto de Magnésio - MgCl₂ (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil) nas concentrações finais de 10mM e 5mM, respectivamente, para inibir a atividade do complemento pela via clássica e por último, *iii)* soro normal sem quaisquer tratamentos.

Após reativação dos isolados em caldo BHI, 500µL de cada cultura foram adicionados a 4,5mL de BHI, e incubados a 37°C por 90 minutos, sob agitação a 170rpm. Após esta etapa, as culturas foram centrifugadas a 1.500 X g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e três mL de PBS pH 7,4 foram adicionados para ressuspender o sedimento.

A resistência ao soro foi analisada por um teste turbidimétrico usando placas de micro titulação em fundo chato (TPP). Para a realização do teste, 120µL de PBS foram colocados nos orifícios da primeira fileira da microplaca, e 120µL da suspensão bacteriana distribuídos nas subseqüentes.

Foram adicionados 60µL de soro, para uma concentração final de 33% nos orifícios da microplaca, que foi levada ao shaker por 15 segundos e depois incubada a 37°C. A absorbância em comprimento de onda de 630nm foi mensurada nos seguintes tempos após a adição do soro: zero, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. Cada isolado foi testado em triplicata para o soro normal e tratado; para o soro inativado utilizou-se uma amostra por isolado, para controle de crescimento. A leitura de fundo (branco) foi considerada a primeira fileira da microplaca na qual continha somente soro e solução PBS.

O isolado que reduziu a absorbância inicial para valores inferiores a 50% da inicial foi considerado sensível. Foram considerados resistentes os isolados

que apresentaram fração sobrevivente superior a 90%, ou seja, maior turvação, e os que ficaram entre esses dois valores foram considerados intermediários.

4.6. Produção de biofilmes

Para detectar a produção de biofilmes foi seguida a metodologia de Stepanovic *et al.* (2004).

Após reativação dos isolados em caldo BHI (Oxoid), 20µL de cada cultura a 3×10^5 UFC/mL 10^8 UFC/mL foram adicionados em triplicata nas cavidades de uma microplaca de poliestireno (TPP), com 96 orifícios e fundo em forma de “U” previamente esterilizadas em radiação ultravioleta (UV), juntamente com 230µL de caldo BHI novo. O controle negativo foi o caldo BHI estéril no volume de 250µL no orifício da placa. Após incubação a 37°C por 24 horas, os conteúdos semeados foram desprezados e cada cavidade foi lavada com 300µL de água destilada estéril, por três vezes. Em cada cavidade foi adicionado 250µL de Metanol (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil) e após 15 minutos o conteúdo foi desprezado, seguindo-se de uma fase para aeração até secagem completa à temperatura ambiente. Em seguida, as cavidades foram preenchidas com 250µL de Cristal Violeta 1% (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) e depois de 10 minutos o excesso de corante foi retirado em água corrente e adicionado 250µL de Ácido Acético Glacial a 33% (Chemco, Campinas, Brasil). Os valores de densidade óptica (D.O.) foram mensurados no leitor de microplaca (Bio-tech ELx800, Winooski, EUA) em comprimento de onda de 570nm e a média aritmética das triplicatas calculadas.

Baseando-se nas D.O produzidas pelos isolados (D.O_i) e tomando-se por base a D.O. média do controle negativo (D.O_C), os isolados foram classificados segundo Stepanovic *et al.* (2004) nas seguintes categorias:

- i)* não produtor ($D.O_i \leq D.O_C$),
- ii)* fraco produtor [$D.O_C < D.O_i \leq (2 \times D.O_C)$],
- iii)* moderado produtor [$(2 \times D.O_C) < D.O_i \leq (4 \times D.O_C)$] e
- iv)* forte produtor de biofilmes [$(4 \times D.O_C) < D.O_i$]

4.7. Pesquisa do antígeno capsular K1

Foi utilizado um teste presuntivo de aglutinação em látex para a detecção qualitativa direta de antígenos K1, denominado kit Pastorex[™] Meningitis (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA). Alíquotas das culturas obtidas foram aquecidas em banho-maria por três minutos a 100°C. Após resfriamento, as suspensões foram submetidas à centrifugação a 1.400 X g por 10 minutos, e utilizadas conforme especificações do fabricante, procedendo-se a leitura macroscópica dos testes sob uma luz incandescente de alta intensidade. A aglutinação é evidente quando a amostra contendo antígenos bacterianos reage com os respectivos anticorpos aderidos ao látex.

4.8. Caracterização genotípica – Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para detectar os seguintes marcadores de virulência: *i*) fatores de colonização (Fímbria tipo 1, K99, F41, Cs31A, F17, F165 e intimina Eae), *ii*) toxinas (STa, STb, LT1, LT2, EAST-1, VT1, VT2, FCN e CLDT), *iii*) Fímbrias marcadoras de isolados extraintestinais de *E. coli* (Pap, Sfa, Afa, Aer e Saa), *iv*) Hemolisinas (Ehly e Hly) e outros marcadores (*kps*, *ipaH*, *eaec* e filogenia), foi realizada no Laboratório de Antígenos Bacterianos II, Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), seguindo-se os protocolos pré-estabelecidos naquela instituição. Foi determinada também a filogenia dos isolados de *E. coli* obtidos de leite mastítico, segundo o esquema proposto por Clermont *et al.* (2000). Todos os marcadores pesquisados, suas atividades patogênicas, locais de codificação e os patotipos mais freqüentes que os expressam estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3. Marcadores de virulência de *Escherichia coli*, suas funções, local onde são codificados e patotipos que os expressam com mais frequência

Marcador de Virulência (Atividade)	Fenótipo/Função	Localização Genômica	Patotipo de <i>E. coli</i> Associado
Fatores de colonização			
Tipo 1	Adesina Fimbrial	Cromossomo	Todos
K99(F5)	Adesina Fimbrial	Plasmidial	ETEC
F41	Adesina Afimbrial	Cromossomo	ETEC
Cs31A	Adesina Afimbrial	Plasmidial	ETEC
F17	Adesina Fimbrial	Cromossomo	ETEC
F165	Adesina Fimbrial	Cromossomo	EXPEC
Eae	Intimina	Cromossomo	EPEC, EHEC
Toxinas			
STa	Toxina	Plasmidial; transposon	ETEC
STb	Toxina	Plasmidial; transposon	ETEC
LT1	Toxina	Plasmidial	ETEC
LT2	Toxina	Cromossomo	ETEC
EAST-1	Toxina	Plasmidial; cromossomo	Vários
VT1	Toxina	Bacteriófago	EHEC
VT2	Toxina	Bacteriófago	EHEC
FCN	Toxina	FCN1 cromossomo e FCN2 plasmidial (vir)	ETEC
CLDT	Toxina	Cromossomo	Vários
Extra-intestinais			
Pap	Adesina fimbrial	Cromossomo	ExPEC
Sfa	Adesina fimbrial	Cromossomo	ExPEC
Afa	Adesina afimbrial	Cromossomo	ExPEC
aer	Aerotaxia	Cromossomo	Vários
saa	Adesina	Cromossomo	EHEC
Ehly	Enterohemolisina	Bacteriófago	EHEC
Hly	α -hemolisina	Plasmidial	EHEC
Outros			
Kps	Cápsula	Cromossomo	MNEC
ipaH	Invasinas	Plasmidial	EIEC
EAEC	Adesina fimbrial	Plasmídeo CVD432	EAggEC

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de toxinas e de fatores citotóxicos de necrose

Dos 27 isolados, apenas quatro deles: *E. coli* 1, 2, 3H e 4 (14,8%) não apresentaram alterações morfo-estruturais compatíveis com efeitos citotóxicos, e tiveram o experimento levado até 72h sem alterações (Tabela 1).

Dois isolados, *E. coli* 25 e 3888 apresentaram alterações compatíveis com o padrão de verotoxina, arredondamento celular e enrugamento (*shriveled*), resultados confirmados pela detecção molecular do gene *vt2* da toxina VT2. Os demais isolados, embora tenham apresentado alterações sugestivas de efeito citotóxico, não puderam ser analisados com especificidade suficiente a ponto de serem classificadas (YANO *et al.*, 1986; BLANCO *et al.*, 1990; SALVADORI *et al.*, 2003), apesar de alguns deles apresentarem genes para outras toxinas, como a STb e EAST-1 (Tabela 2).

As principais alterações constatadas foram alongamento e morte celular. O alongamento das células foi notado principalmente nas bordas dos orifícios da placa sem estar associado ao espessamento da parede celular e à presença de filamentos dendríticos. De acordo com Yano *et al.* (1986), este efeito foi desconsiderado e julgado não compatível com padrão LT. Também em nenhum dos 27 isolados houve desenvolvimento de células gigantes multinucleadas, efeito este compatível com ação de FCN. Esses resultados estão de acordo com os resultados do teste da PCR que verificou a ausência de genes que expressam os fatores mencionados. A morte celular ocorreu principalmente no centro da placa, promovendo descolamento das células e tornando o tapete celular mais heterogêneo e disforme, com real espaçamento entre elas, sendo considerado um efeito citotóxico inespecífico.

Tabela 1. Perfil de resultados de isolados de *Escherichia coli* em ensaios de citotoxicidade em células Vero

Isolados	24h/Título	48h/Título	72h/Título	Efeitos Visualizados
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3E	-	+/80	+/80	Alongamento e morte celular
3H	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	+/1280	Morte celular
23	-	+/1	+/1	Morte celular
24	-	+/160	+/320	Alongamento e morte celular
25	-	+/1	+/1	Arredondamento celular
26	-	+/20	+/40	Morte celular
27	+/1	+/1	+/1280	Alongamento e morte celular
29	-	-	+/1280	Morte celular
30	-	-	+/640	Morte celular
39	-	+/1	+/1	Morte celular
51	-	-	+/1280	Morte celular
53	-	+/1280	+/1280	Morte celular
54	-	+/1280	+/1280	Morte celular
219	-	+/1280	+/1280	Alongamento e morte celular
2058	-	-	+/1	Morte celular
3397	+/20	+/320	+/1280	Alongamento, filamentos e morte celular
3536	-	+/1280	+/1280	Alongamento e morte celular
3888	+/1	+/1	+/1	Arredondamento celular
3889	-	-	+/40	Morte celular
3890	+/20	+/40	+/320	Alongamento e morte celular
3901	-	+/1	+/1	Alongamento, filamentos e morte celular
3922	+/1	+/1	+/1	Morte celular
3950	-	+/1	+/1	Células arredondadas e com filamentos
Controles				
O157:H7(VT1)	+/1	+/80	+/320	Células arredondadas e morte celular
J2(VT2)	-	+/1	+/1280	Células arredondadas e morte celular
40T(LT1)	+/1	+/20	+/1280	Alongamento e morte celular
B62(LT2)	-	+/1	+/20	Células triangulares e morte celular
MR48(FCN1)	-	+/1	+/40	Morte celular
B26(FCN2)	-	+/1	+/20	Morte celular

h = horas.

Verificou-se que os efeitos citotóxicos foram mais expressivos na presença da menor diluição dos filtrados, indicando presença de substância citotóxica e em maior concentração. Após 24h de incubação das placas 18,5% dos isolados apresentaram alterações no tapete celular. Em 48h de incubação 44,5% dos isolados apresentaram efeitos citotóxicos (positividade acumulada

63%). E após 72h de incubação 22% dos isolados apresentam efeitos citotóxicos (positividade acumulada 85%). Na análise das 48h obteve-se o efeito citotóxico em um maior número de isolados, mas em menores títulos. Porém, na análise das 72h foi obtido o efeito citotóxico até nos maiores títulos, considerando que a partir daí haveria perda da especificidade do experimento, pois já na presença de um filtrado bastante diluído a instabilidade do tapete celular já se manifestava por si só, e o experimento não foi levado à frente.

As Figuras 1 a 4 ilustram a evolução do efeito citotóxico apresentado pela monocamada de células Vero, diante da adição do filtrado bacteriano com Mitomicina C do isolado *E. coli* 3E (efeito citotóxico inespecífico). As Figuras 5 e 6, mostram, respectivamente os isolados de *E. coli* 25 e 3888, que apresentaram efeitos citotóxicos com características morfo-estruturais compatíveis com efeito de verotoxinas.

Na análise genotípica realizada pelo teste da PCR (Tabela 2) nenhum dos isolados continham genes que codificam a produção das toxinas STa, LT1, LT2, VT1, FCN e CLDT. O gene que se apresentou mais vezes foi o da toxina STb, em 15 dos isolados (55,5%). Em oito dessas culturas, esse gene apresentou-se isolado, enquanto nas demais se apresentou associado a outros marcadores de patogenicidade (com o do fator de colonização Cs31A ou da VT2 ou *astA*) (Tabela 3). Considerando os relatos de Yano *et al.* (1986), que se referem à determinação de toxinas termoestáveis apenas por procedimentos *in vivo*, este fator de virulência foi somente analisado por métodos genotípicos.

Tabela 2. Caracterização genotípica, realizada por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), dos isolados de *Escherichia coli* testados frente a fatores de colonização, toxinas, marcadores extraintestinais e outros mais relacionados com agentes da mastite

Isolados	Fatores de Colonização							Toxinas						Marcadores extraintestinais						Outros		Filogenia*				
	Fimbria Tipo 1	K99	F41	Cs31A	F17	F165	eae	STa	STb	LT1	LT2	EAST-I	VT(1/2)	CNF	CLDT	Pap	sfa	AFA	aer	saa	Ehly		hly	kps	ipaH	CVD432
1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1
3E	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1
3H	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	A
23	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
24	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
25	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
26	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
27	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
29	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
30	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-/-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	A
39	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
51	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1
53	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
54	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B1
219	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
2058	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
3397	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
3536	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
3888	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
3889	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
3890	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
3901	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
3922	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
3950	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A

* A = Isolados comensais; B1 = isolados comensais relacionados a mamíferos não primatas (HERZER *et al.*, 1990).

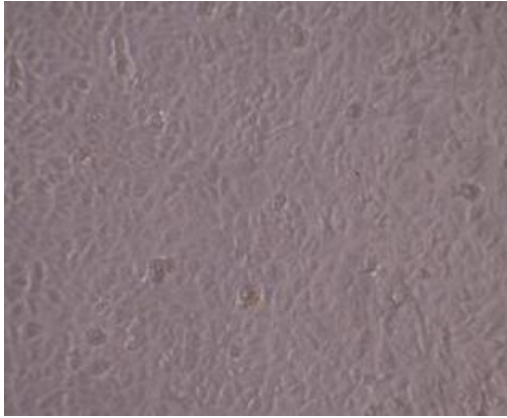


Figura 1. Monocamada de células Vero intactas, sem adição de filtrado bacteriano (Controle negativo). 400X.

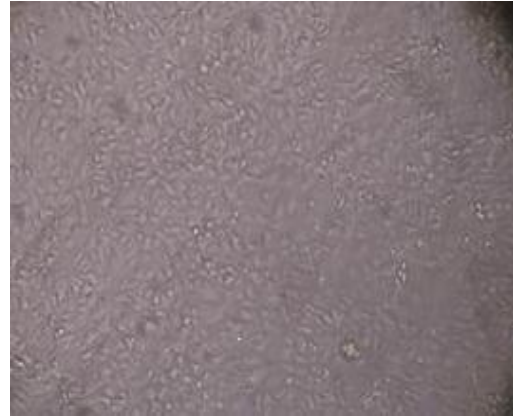


Figura 2. Monocamada de células Vero após 24h de incubação com adição do filtrado bacteriano de *E. coli* 3E. Efeito citotóxico ausente. 400X.

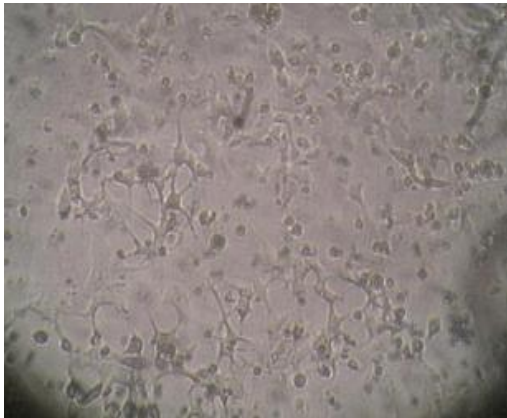


Figura 3. Monocamada de células Vero após 48h de incubação com adição do filtrado bacteriano de *E. coli* 3E. Efeito citotóxico: alongamento e morte celular inicial. 400X.

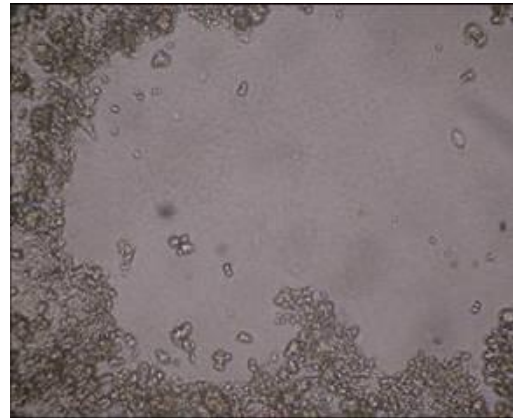


Figura 4. Monocamada de células Vero após 72h de incubação com adição do filtrado bacteriano de *E. coli* 3E. Efeito citotóxico: morte celular (células dispersas no meio). 400X

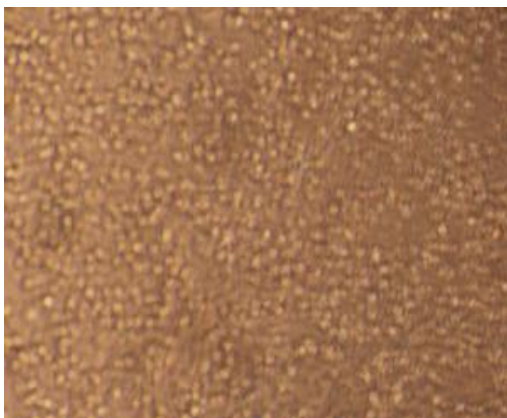


Figura 5. Monocamada de células Vero após 48h, incubação com adição do filtrado bacteriano de *E. coli* 25. Efeito citotóxico: arredondamento compatível com verotoxina. 400X.

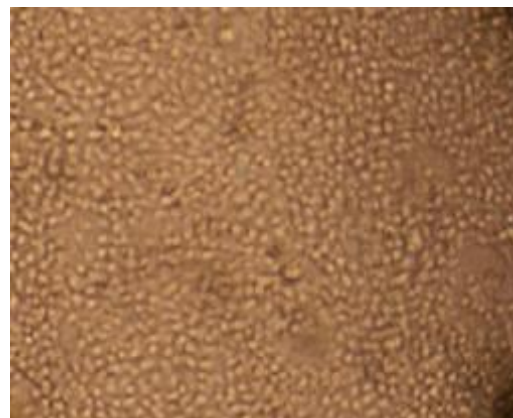


Figura 6. Monocamada de células Vero após 48h de incubação com adição do filtrado bacteriano, *E. coli* 3888. Efeito citotóxico: arredondamento compatível com verotoxina. 400X.

Tabela 3. Combinações de marcadores de virulência detectados em isolados de *Escherichia coli* obtidos de leite mastítico

Combinações de marcadores*	Numero de Isolados (%)	Isolados
Fímbria tipo 1, Cs31A, STb, Pap, aer	1 (3,7)	30
Fímbria tipo 1, Cs31A, STb	3 (11,1)	3H, 23 e 3890
Fímbria tipo 1, EAST-1, kps	1 (3,7)	5
Fímbria tipo 1, STb, VT2	2 (7,4)	25 e 3888
Fímbria tipo 1, Cs31A, EAST-1	1 (3,7)	51
Fímbria tipo 1, STb, EAST-1	1 (3,7)	54
Fímbria tipo 1, STb	8 (29,6)	1, 26, 27, 29, 53, 3397, 3889 e 3950
Fímbria tipo 1, Cs31A	3 (11,1)	2, 3E e 24
Fímbria tipo 1, Pap	1 (3,7)	3536
Fímbria tipo 1	6 (22,2)	4, 39, 219, 2058, 3901 e 3922
Total	27 (100)	

* Legenda na Tabela 1.

O gene *astA*, responsável pela codificação da enterotoxina termoestável EAST1, foi presente em três isolados (11,1%). Osek (2003) refere-se a esta toxina como sendo um fator de virulência em potencial na patogênese de diarreia em humanos e animais (especialmente em suínos) por linhagens de EAggEC. Kaper e Nataro (2004) também admitem esta correlação, mas citam os trabalhos de Menard e Dubreuil (2002) que mencionam presença do gene para enterotoxina EAST1 em *E. coli* comensais. Não há associações desse gene em cepas de *E. coli* causadoras de mastite, porém relatos de Bertin *et al.* (1998), que trabalharam com 56 culturas de *E. coli* isoladas a partir de vacas com diarreia ou septicemia, demonstraram a presença de EAST1 em 66% de suas amostras. Além disso, a enterotoxina EAST1 foi detectada entre 87% de *E. coli* Cs31A positivas, ficando estabelecida uma estreita relação entre EAST1 com o fator de aderência Cs31A, observação esta também encontrada no isolado *E. coli* 51 deste experimento (Tabela 3).

A ausência de isolados positivos para LT neste experimento não confirmou os achados de Alkaff *et al.* (1991) que procurando estabelecer a importância da produção de enterotoxinas em 117 culturas de *E. coli* provenientes de casos de mastite bovina, na Alemanha, verificaram que sete isolados (6%) apresentaram efeito citotóxico compatível com LT em cultura celular. A ausência de FCN entre os 27 isolados deste experimento também

discorda dos achados de outros estudos. Ao investigarem a ocorrência de FCN em 553 isolados de *E. coli* isoladas em diferentes afecções em vários tipos de animais, na Bélgica, entre 1977 e 1992, Pohl *et al.* (1993) detectaram sete (24,1%) culturas produtoras de FCN em 29 culturas de *E. coli* hemolíticas isoladas de mastite. Destas, seis culturas foram caracterizadas como FCN1 e uma FCN2. No mesmo estudo, os autores afirmaram que a ocorrência descrita provavelmente esteja subestimada, em virtude de o estudo restringir-se a isolados hemolíticos do agente. Isso não se aplica neste trabalho, pois todos os isolados foram submetidos aos testes. Ribeiro *et al.* (2006) detectou efeito citopático compatível com FCN em apenas um isolado (0,8%) de *E. coli* causadora de mastite clínica.

Como culturas de VTEC são isoladas a partir de fezes de bovinos, a possibilidade de se isolar este tipo de *E. coli* em mastites foi explorada por Nemeth *et al.* (1994). Entretanto, somente 8% dos isolados foram citotóxicos em células Vero. Da mesma forma, Barrow e Hill (1989), previamente mostraram que somente um isolado (0,5%) dos 237 de *E. coli* causadoras de mastite produziu verotoxinas. Também esses mesmos autores verificaram efeito citopático em células Vero compatível com a produção de VT em cinco isolados (4,2%), oriundos de 80 casos de mastite clínica e 40 de mastite subclínica. Esta baixa porcentagem está de acordo com o resultado deste trabalho, onde apenas dois isolados *E. coli* 25 e 3888 (7,4%) (Tabela 1), foram produtores de citotoxicidade em células Vero e amplificaram para o gene da verotoxina VT2 (Tabela 2). Entretanto, Sandrini *et al.* (2007) estudando a presença de VTEC em 60 propriedades rurais da bacia leiteira de Pelotas-RS, verificaram a presença dessa em 49% (119/243) nas fezes dos animais testados, em 5% (3/60) das amostras de água para consumo humano, em 8,35% (5/60) das amostras de água para consumo animal e em 5% (3/60) das amostras de leite.

5.2. Pesquisa de hemolisinas

Em nenhum dos 27 isolados foi detectada a produção de enterohemolisina assim como a de α -hemolisina, nas análises realizadas nos tempos predeterminados. Observou-se que apenas os controles positivos, *E.*

coli FVL-16 e C3888, de α -hemolisina e enterohemolisina, respectivamente, apresentaram resultados positivos. As Figuras 7 e 8 mostram a ação da α - e enterohemolisinas dessas culturas controle nas placas de Agar sangue.

Barrow e Hill (1989) ao pesquisarem fatores de virulência em 237 *E. coli* isoladas de mastite na Grã-Bretanha, observaram a produção de hemolisinas (α -hemolisinas) em apenas 5% e descreveram essa característica, juntamente com outros fatores de virulência, como marcadores normalmente associados com tipos invasivos ou enteropatogênicos de *E. coli*. Assim, pelo fato de que apenas alguns isolados apresentaram este fator, consideraram que no geral, as amostras analisadas não definiam um padrão, mas sim refletiam uma ocorrência ocasional em comparação com padrões intestinais.

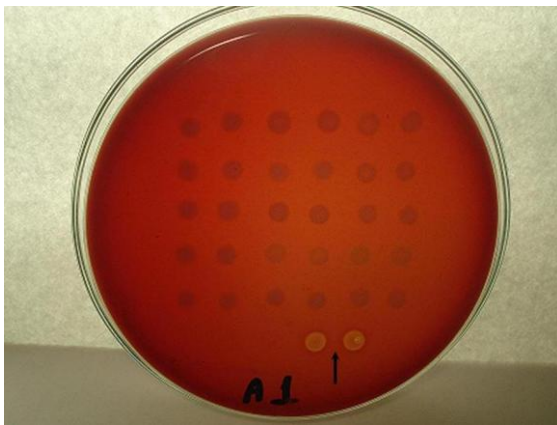


Figura 7. Ação de α -hemolisina (seta preta) produzida pela *Escherichia coli* FVL-16 (controle positivo) em Agar Sangue 5% após 3h de incubação a 37°C.

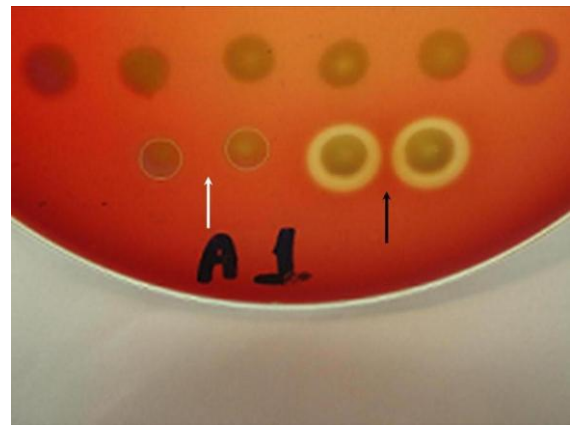


Figura 8. Ações de enterohemolisina (seta branca) produzida pela *Escherichia coli* C3888 (controle positivo) e de α -hemolisina (seta preta) produzidas pela *Escherichia coli* FVL-16 (controle positivo) após 24h de incubação a 37°C .

Em 76 isolados de *E. coli* de mastite clínica bovina nos EUA, Hogan *et al.* (1990), encontraram este efeito hemolítico respectivamente em 3,9 e 2,6% dos isolados submetidos ao meio de cultura contendo hemácias lavadas de ovinos e bovinos. Ribeiro *et al.* (2006) analisaram 120 culturas de *E. coli* isoladas de mastite bovina e verificaram α -hemolisina em oito (6,7%) e não detectaram produção de enterohemolisinas. Dessa forma, vários estudos (BEUTIN *et al.*, 1988, 1989; BEUTIN e MONTENEGRO, 1990; MAINIL *et al.*,

1999) concluem que as hemolisinas devem contribuir na virulência de *E. coli* no desenvolvimento da mastite, embora, provavelmente, não representem mecanismos essenciais na ocorrência de infecções clínicas na glândula mamária bovina (RIBEIRO *et al.*, 2006). Isto poderia explicar a ausência dessas hemolisinas nos isolados de *E. coli* estudados, visto que foram isolados de mastite clínica. Têm-se observado a produção de α -hemolisina em índices iguais ou superiores a 30% em outras afecções extra-intestinais nos animais e no homem, notadamente em peritonites, meningites, infecções urinárias e septicemias (LUDWIG e GOEBEL, 1997). Nestas, a disponibilização do ferro mediante a ação hemolítica de determinados isolados de *E. coli*, bem como a ação nos neutrófilos, são mecanismos bem caracterizados na virulência do agente. Desta forma, a produção deste fator de virulência provavelmente contribui na patogenicidade de *E. coli* na mastite, embora pareça não representar um fator primário no estabelecimento de infecções clínicas na glândula mamária bovina (RIBEIRO *et al.*, 2006).

No presente estudo, nenhum isolado apresentou efeito compatível com a produção de enterohemolisina. Semelhante à α -hemolisina, a produção de enterohemolisina provavelmente não possui relação direta com o estabelecimento de mastite. Entretanto, sua detecção em linhagens de *E. coli*, assume importância no contexto de Saúde Pública em virtude de relatos de sua eventual associação com VTEC ou EPEC (BEUTIN *et al.*, 1988; LUDWIG e GOEBEL, 1997).

5.3. Resistência aos antimicrobianos

Embora os isolados apresentem-se não resistentes *in vitro* frente à maioria dos antimicrobianos testados, nove (33,3%) apresentaram-se resistentes ao Sulfadiazol, enquanto quatro (14,8%) foram resistentes a Ampicilina (Tabela 4). Foram encontrados também isolados de *E. coli* apresentando resistência intermediária a Neomicina (3,7%) e ao Sulfadiazol (18,5%). Dados apresentados na Tabela 4.

A Figura 9 mostra a cepa ATCC controle usado na realização do antibiograma. Os maiores índices de sensibilidade *in vitro* (100%) foram observados para Cefalexina, Cefoperazone, Ceftiofur, Enrofloxacin,

Gentamicina e Florfenicol; seguida da Neomicina com 96,3% de sensibilidade. Quatro isolados (14,8%), *E. coli* 30 (Figura 10), 3536, 3890 e 3950 apresentaram resistência simultânea à Ampicilina e ao Sulfadiatrim (Tabela 4).

Tabela 4. Perfil de resistência dos isolados de *Escherichia coli* encontrado frente aos antimicrobianos testados

Antimicrobianos	Nº de Isolados Sensíveis	Nº de Isolados Intermediários	Nº de Isolados Resistentes
Ampicilina	23 (85,2%)	-	4 (14,8%)
Cefalexina	27 (100%)	-	-
Cefoperazone	27 (100%)	-	-
Ceftiofur	27 (100%)	-	-
Enrofloxacina	27 (100%)	-	-
Florfenicol	27 (100%)	-	-
Gentamicina	27 (100%)	-	-
Neomicina	26 (96,3%)	1 (3,7%)	-
Sulfadiatrim	13 (48,2%)	5 (18,5%)	9 (33,3%)

N = número de isolados.



Figura 9. Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 em Ágar Muller Hinton. Controle de medida dos halos.



Figura 10. Isolado de *Escherichia coli* 30 em Ágar Muller Hinton apresentando perfil de resistência à Ampicilina e ao Sulfadiatrim, simultaneamente.

Soogard (1982), na Dinamarca, analisou a resistência bacteriana *in vitro* em 131 isolados de *E. coli* provenientes de casos de mastite bovina clínica e subclínica. Dentre os antimicrobianos testados constatou os maiores índices de resistência para ampicilina (22,6%), neomicina (13,6%) e cloranfenicol (7,5%). Referiu também a ocorrência de resistência múltipla de *E. coli* ao redor de 50%

dos antimicrobianos ensaiados, ressaltando a resistência simultânea a cinco drogas, em oito cepas (6,1%). Barrow e Hill (1989), na Inglaterra, referiram a resistência a um ou mais antimicrobianos em 22% dos isolados, destacando os maiores índices de resistência do agente para ampicilina (14%). Neste presente estudo 33,3% dos isolados foram resistentes para Sulfadiatrim, e 14,8% para Ampicilina.

Em relação à crescente resistência “*in vitro*” aos antimicrobianos em *E. coli* isoladas de mastite, Ribeiro (2006), cita os estudos de Stephan e Rüsç (1997) realizados na Alemanha que demonstraram em 95 isolados, 29% dos seus isolados resistentes (uma a sete drogas), com os maiores índices constatados para sulfametoxazol (23,1%), tetraciclina (19%) e ampicilina (16,8%). Ribeiro *et al.* (2006) também verificaram as maiores taxas de resistência para Ampicilina (24,1%) e da Sulfa-Trimetoprim (12,5%), embora tenham identificado 13,3% de isolados resistentes a Ceftiofur, enquanto no presente estudo 100% foram sensíveis.

Os achados neste estudo relacionados ao perfil de resistência dos isolados de *E. coli* aos antimicrobianos usados no tratamento da mastite definem um padrão de baixa resistência, comparados com os estudos de Soogard (1982); Barrow e Hill (1989) e de Ribeiro *et al.* (2006).

Resistência simultânea a Ampicilina e a Sulfadiatrin foi observada em 14,8% dos isolados, concordando com os resultados dos estudos discutidos acima e com os estudos de Ribeiro *et al.* (2006). Em seus estudos, 20% dos isolados de *E. coli* obtidos de leite mastítico mostraram resistência a dois ou mais antimicrobianos, incluindo drogas consideradas efetivas na terapia do agente. Assim a ocorrência crescente de *E. coli* multiresistentes em casos de mastite bovina pode decorrer do uso indiscriminado de antimicrobianos na terapia intramamária e/ou parenteral, no emprego de subdosagens, ou mesmo no tratamento sem o respaldo de testes de sensibilidade microbiana, recaindo a escolha da droga na experiência de terapias anteriores ou no apelo comercial dos produtos.

5.4. Resistência ao soro

Apenas um isolado foi considerado sensível (3,7%), 11 intermediários (40,7%) e 15 deles (55,5%) resistentes a ação do soro bovino *in vitro* (Tabelas 5 e 6).

Os isolados de *E. coli* puderam ser divididos nos três grupos mencionados, de acordo com o seu crescimento na presença de 33% de soro bovino. Para todos os grupos, a curva de crescimento se apresentou similar na presença do soro normal e tratado com EGTA, definindo uma curva padrão, segundo a metodologia adotada.

Na década de 80, Sanchez-Carlo *et al.* (1984), analisando 184 culturas de *E. coli* isoladas de vacas com mastite clínica aguda, desafiadas contra produção de enterotoxinas, poder de invasividade e resistência ao soro, concluíram que a habilidade de resistência ao soro foi a única propriedade que poderia estar relacionada com virulência, pois a quase totalidade de seus isolados (99,5%) se apresentaram resistentes e somente um se apresentou fracamente sensível. Em nosso estudo, embora 55,5% dos isolados foram dados como resistentes, pode-se considerar a parcela dos isolados com comportamento intermediário (40,7%), como “potencialmente” resistentes ao soro, elevando o perfil de resistência para quase totalidade dos isolados tomados para análise, já que somente um deles se mostrou sensível autêntico, onde podemos estabelecer no mínimo, uma estreita correlação com as observações de Carroll (1973) e Sanchez-Carlo (1984). Considerando as observações de Nemeth *et al.* (1991) que também encontrou uma comparativamente baixa porcentagem de isolados resistentes (64%) em relação a outros achados, relacionou esta diferença com a possibilidade de ser devido às variações nas metodologias e na concentração do soro usado em outras pesquisas.

Vários outros autores mencionam a avaliação da resistência ao soro da mesma forma: i) Barrow e Hill (1989) utilizando-se da metodologia de referência para avaliação da resistência ao soro (Contagem de células viáveis) observaram em 230 dos 233 isolados testados (98,7%) a habilidade de resistir à incubação ao soro. Sugerem que esta característica de virulência foi a mais importante de seus isolados, particularmente em relação à sobrevivência no úbere.

ii) Nemeth et al., em 1994, se referem à habilidade para resistir ao soro, como sendo o único potencial fator de virulência associado a *E. coli* isoladas de mastite bovina, pois encontrou 76% de positividade nos seus isolados de mastite, 84% nos isolados fecais de vacas com mastite e 66% dos isolados fecais de vacas sadias. iii) Fang e Pyörala (1995) concluíram que 68% de seus isolados de *E. coli*, de um total de 169 isolados de mastite clínica bovina, foram resistentes ao soro. Elucidaram também, que esta qualidade não apresentava correlação com o perfil de resistência aos antimicrobianos. Esses dados estão de acordo com os resultados aqui discutidos, não houve correlação entre as resistências, ao soro e aos antimicrobianos nos 27 de *E. coli* isoladas de leite mastítico.

Tabela 5. Valores de absorvância definindo o perfil de resistência dos isolados de *Escherichia coli* encontrado frente ao soro tratado.

Isolados	0min	30min	60min	90min	120min	180min	%	Resultado
3922	0,325	0,317	0,345	0,349	0,343	0,338	104,0	resistente
29	0,329	0,327	0,351	0,346	0,341	0,338	102,7	resistente
3397	0,306	0,342	0,336	0,328	0,320	0,310	101,3	resistente
2058	0,302	0,320	0,321	0,313	0,310	0,304	100,7	resistente
27	0,327	0,327	0,341	0,335	0,334	0,322	98,5	resistente
3888	0,322	0,355	0,335	0,326	0,324	0,317	98,4	resistente
26	0,362	0,354	0,378	0,372	0,366	0,356	98,3	resistente
219	0,297	0,321	0,302	0,296	0,291	0,285	96,0	resistente
4	0,384	0,401	0,387	0,375	0,373	0,367	95,6	resistente
3890	0,253	0,253	0,239	0,238	0,236	0,237	93,7	resistente
3H	0,324	0,325	0,301	0,295	0,299	0,300	92,6	resistente
3950	0,270	0,272	0,265	0,260	0,259	0,250	92,6	resistente
2	0,405	0,441	0,415	0,375	0,378	0,374	92,3	resistente
3901	0,254	0,259	0,244	0,240	0,239	0,234	92,1	resistente
39	0,351	0,385	0,351	0,331	0,327	0,319	90,9	resistente
1	0,329	0,329	0,314	0,300	0,301	0,297	90,3	resistente
3E	0,408	0,415	0,391	0,386	0,380	0,368	90,2	resistente
3889	0,294	0,291	0,273	0,267	0,267	0,260	88,4	intermediário
3536	0,383	0,353	0,338	0,343	0,339	0,337	88,0	intermediário
5	0,366	0,373	0,239	0,344	0,333	0,316	86,3	intermediário
30	0,353	0,386	0,329	0,310	0,306	0,297	84,1	intermediário
51	0,211	0,210	0,196	0,185	0,176	0,171	81,0	intermediário
24	0,366	0,341	0,308	0,279	0,267	0,259	70,8	intermediário
25	0,240	0,191	0,157	0,147	0,147	0,156	65,0	intermediário
23	0,295	0,267	0,215	0,195	0,190	0,191	64,7	intermediário
53	0,275	0,266	0,190	0,175	0,168	0,152	55,3	intermediário
54	0,346	0,312	0,258	0,225	0,209	0,169	48,8	sensível

% = variação da absorvância em porcentagem considerando a leitura inicial de 100%.

Tabela 6. Valores de absorvância definindo o perfil de resistência dos isolados de *Escherichia coli* encontrado frente ao soro não tratado.

Isolados	0min	30min	60min	90min	120min	180min	%	Resultado
3922	0,264	0,266	0,263	0,260	0,266	0,292	110,6	resistente
26	0,344	0,364	0,388	0,384	0,380	0,372	108,1	resistente
3950	0,253	0,261	0,260	0,258	0,258	0,268	105,9	resistente
27	0,338	0,349	0,365	0,363	0,360	0,353	104,4	resistente
3E	0,362	0,381	0,387	0,383	0,379	0,372	102,8	resistente
3889	0,318	0,335	0,338	0,330	0,323	0,321	100,9	resistente
3536	0,334	0,341	0,345	0,345	0,340	0,337	100,9	resistente
3890	0,298	0,296	0,273	0,264	0,259	0,297	99,7	resistente
3H	0,357	0,376	0,364	0,363	0,363	0,349	97,8	resistente
2	0,402	0,424	0,407	0,406	0,396	0,379	94,3	resistente
2058	0,318	0,306	0,305	0,305	0,300	0,299	94,0	resistente
3901	0,235	0,231	0,224	0,215	0,213	0,220	93,6	resistente
39	0,345	0,339	0,334	0,324	0,320	0,319	92,5	resistente
1	0,365	0,362	0,338	0,330	0,335	0,337	92,3	resistente
4	0,419	0,415	0,402	0,395	0,392	0,386	92,1	resistente
24	0,341	0,339	0,333	0,306	0,300	0,296	86,8	intermediário
3397	0,317	0,308	0,294	0,278	0,268	0,258	81,4	intermediário
5	0,414	0,410	0,401	0,373	0,354	0,336	81,2	intermediário
3888	0,402	0,400	0,390	0,355	0,340	0,323	80,3	intermediário
51	0,231	0,223	0,209	0,200	0,191	0,177	76,6	intermediário
29	0,289	0,312	0,334	0,339	0,342	0,220	76,1	intermediário
219	0,321	0,311	0,308	0,280	0,260	0,241	75,1	intermediário
23	0,316	0,265	0,230	0,213	0,212	0,234	74,1	intermediário
30	0,362	0,335	0,295	0,257	0,240	0,228	63,0	intermediário
53	0,236	0,209	0,179	0,161	0,155	0,147	62,3	intermediário
25	0,262	0,218	0,181	0,162	0,155	0,154	58,8	intermediário
54	0,326	0,310	0,276	0,221	0,194	0,164	49,9	Sensível

% = Variação da absorvância em porcentagem considerando a leitura inicial de 100%.

5.5. Produção de biofilmes

Todos os isolados testados apresentaram-se produtores de biofilme *in vitro* (Tabela 7). Dos 27 isolados, cinco (18,6%) se apresentaram grandes produtores, 11 isolados (40,7%) moderados produtores e igualmente 11 isolados (40,7%) se apresentaram fracos produtores de biofilme.

Resultados dos estudos de Dopfer *et al.* (1999), que avaliam a recorrência de mastite clínica por *E. coli* em rebanhos leiteiros na Holanda, demonstram que episódios recorrentes em algum dos quartos de uma vaca são altos e sugerem o envolvimento de um fator do animal que em adição com fatores de virulência do patógeno, podem resultar em uma elevada

susceptibilidade para infecções intramamárias em alguns animais. Estes resultados, segundo eles, criam uma necessidade de se estudar a patogênese da mastite persistente causada por *E. coli*, como uma reavaliação do emergente reservatório intramamário deste agente e a sua evolução para recorrência do episódio clínico de mastite durante a infecção intramamária persistente. Levando-se em conta que a formação de biofilmes por *E. coli* está relacionada na patogênese de várias infecções crônicas em humanos tais como prostatite bacteriana e infecções do trato biliar (DONLAN e COSTERTON, 2002), e o fato de que a *E. coli* é um dos maiores patógenos envolvidos na mastite bovina, a dificuldade de tratamento em infecções mamárias recorrentes pode estar relacionada com a habilidade deste patógeno em formar biofilmes, assim como, sua maior capacidade de superar o sistema de defesa do animal (MELCHIOR *et al.*, 2006).

Considerando que a formação de biofilmes bacterianos protege suas células contra a atividade fagocítica dos macrófagos (JOHNSON *et al.*, 1986), a presença desta capacidade em todos os isolados de *E. coli* obtidos de leite mastítico é um dado preocupante, visto que poderá resultar em mastites recidivantes logo após o término da terapia antimicrobiana.

5.6. Pesquisa do antígeno capsular K-1

O teste presuntivo de aglutinação em látex para a detecção qualitativa direta de antígenos K1 de *E. coli*, neste estudo, apresentou-se negativo para todos os 27 isolados de *E. coli*. O antígeno capsular K1 foi demonstrado ser um importante fator de virulência em *E. coli* na patogênese de doenças extraintestinais em humanos (TAYLOR, 1983; AGUERO *et al.*, 1984) por bloqueio da ação do complemento na célula bacteriana.

Nemeth *et al.* (1991), detectou apenas 3% de seus isolados, como positivos para o antígeno K1, analisando 225 *E. coli* provenientes de filtros de máquinas de extração leiteira, amostras de leite e amostras fecais Verotoxigênicas e enterotoxigênicas. Kaipainen *et al.* (2002), analisando 273 culturas de *E. coli*, não detectaram antígeno capsular K1 em todos os seus isolados, achados estes concordantes com o presente estudo. Assim como Kaipainen *et al.* (2002) este estudo se apresentou limitado na tentativa de se

fazer a correlação deste antígeno com a resistência ao poder bactericida do soro. Barrow e Hill (1989) conclui que a relação resistência ao soro e presença de cápsula, não é muito clara, pois de quatro isolados capsulados testados, três deles foram soro-resistentes, mas outros isolados não capsulados também se apresentaram soro-resistentes.

Diante do que foi discutindo, a Tabela 7 mostra os resultados gerais da detecção dos fatores de virulência de isolados de *Escherichia coli* obtidos de leite mastítico por testes fenotípicos.

Tabela 7. Resultados gerais da detecção dos fatores de virulência de isolados de *Escherichia coli* obtidos de leite mastítico, por testes fenotípicos

isolados	Biofilmes	Fatores de Virulência – Análise Fenotípica											Resistência ao Soro	Toxinas			Antígeno Capsular K1		
		Hemolisinas		Sensibilidade microbiana								VT		LT	CNF				
		Alfa	Entero	Ampicilina	Cefalexina	Cefoperazone	Ceftiofur	Enrofloxacina	Florfenicol	Gentamicina	Neomicina					Sulfadiazol			
1	G	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	-	-	-	-
2	M	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-	-	-	-
3E	M	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-	-	-	-
3H	F	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	-	-	-	-
4	M	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	-	-	-	-
5	F	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-
23	F	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-
24	M	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-
25	F	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	+	-	-	-
26	M	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-	-	-	-
27	F	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-	-	-	-
29	F	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-
30	F	-	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	I	-	-	-	-
39	F	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	-	-	-	-
51	G	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-
53	G	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-
54	G	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-
219	M	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	-	-	-	-
2058	F	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	-	-	-	-
3397	F	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	-	-	-	-
3536	M	-	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	-	-	-	-
3888	M	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	+	-	-	-
3889	M	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	-	-	-	-
3890	M	-	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	-	-	-	-
3901	G	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	-	-	-	-
3922	M	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	-	-	-	-
3950	F	-	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	-	-	-	-

S = sensível; R = resistente, I = intermediário, G = grande produtor de biofilme; M = médio produtor; e F = fraco produtor.

5.7. Caracterização genotípica

Todos os isolados testados apresentaram ao menos um marcador de virulência (Tabela 2), sendo o antígeno fimbrial do tipo 1 comum a todos. Nenhum dos isolados continham genes para os fatores de colonização (fímbrias K99, F41, F17 e F165 e a intimina Eae), para as toxinas (STa, LT1, LT2, VT1, FCN e CLDT), para os marcadores fimbriais extraintestinais (*sfa*, *afa* e *saa*) e para as hemolisinas (Ehly e hly), assim como para invasina *ipaH* e

para o plasmídeo CVD432, marcador de EAEC. Todos esses genes são relacionados com *E. coli* patogênicas e relatados em experimentos que tentam correlacioná-los com a etiologia da mastite bovina (LIPMAN *et al.*, 1995; KAIPAINEN *et al.*, 2002; BEAN *et al.*, 2004; WENZ *et al.*, 2006).

Ao agrupar os marcadores de virulência, verificou-se que somente o marcador para fímbria tipo 1 foi detectado isoladamente, sendo os demais detectados em diferentes associações (Tabela 3). Esse marcador de virulência codifica um tipo de fímbria comum, bastante estudada em *E. coli* e caracterizada por sua habilidade de ligação a resíduos de *D*-manose presentes em uma grande variedade de superfícies celulares (SUSSMAN, 1997). Além de estarem presentes em isolados clínicos, também são expressas por comensais o que dificulta a determinação de seu papel na virulência deste agente (SUSSMAN, 1997).

Wenz *et al.* (2006) na tentativa de avaliar a presença do gene *cs31a*, em 123 isolados obtidos de vacas apresentando graus variados de severidade clínica associados à mastite, observaram a presença deste gene em somente um dos isolados. Este gene responsável pela expressão da adesina afimbrial CS31A foi anteriormente descrito em *E. coli* de vacas com diarreia ou sépticas (BERTIN *et al.*, 1998).

Lipman *et al.* (1995) em um total de 20 *E. coli* isoladas a partir de casos de mastite bovina examinaram a produção de fímbrias. Onze dos seus 20 isolados foram considerados positivos para fímbria F17, contrapondo os dados deste estudo que não conseguiu detectá-los (Tabela 2). Kaipainen *et al.* (2002) identificaram os seguintes genes: 11% de *aer*, 9% de *f17*, 8% de *sfa*, 7% de *pap*, 1% de *afa8D* e 1% de *afa8E* em seus isolados da Finlândia; e 4% de *aer*, 1% de *sfa* e 1% de *f17* em seus isolados provenientes de Israel, porém em nenhum dos isolados o fator de colonização Cs31A, se apresentou. Esse dado discorda com os resultados relatados no presente estudo, no qual esteve presente em 29,6% dos isolados.

Alguns dos genes que codificam os marcadores de virulência detectados nesse estudo estão presentes em formas genéticas móveis como plasmídeos (Cs31A, STb e EAST1) e bacteriófagos (VT2) (Quadro 3). A presença desses fatores de virulência em *E. coli* isoladas de leite mastítico é preocupante, pois favorece a transferência horizontal destes genes para linhagens de bactérias

não virulentas da mesma espécie, ou mesmo de outras espécies, levando a um alto grau de adaptabilidade destes agentes em outros ambientes e até mesmo no homem, tendo o leite como principal veículo de transmissão.

A análise filogenética tem demonstrado que as cepas de *E. coli* dividem-se em quatro grandes grupos - A, B₁, B₂ e D (HERZER *et al.*, 1990). Cepas virulentas extra-intestinais pertencem principalmente ao grupo B₂, e com menor freqüência ao grupo D, enquanto que a maioria das cepas comensais pertence ao grupo A e B₁. Estudos têm mostrado a necessidade de buscar o entendimento de como cepas patogênicas adquirem genes de virulência (BINGEN *et al.*, 1998). Certos genes ou fragmentos de DNA podem ser marcadores de grupos filogenéticos específicos. Com relação à análise filogenética, 23 (85%) das culturas de *E. coli* analisadas se apresentaram compatíveis com o grupo A (amostras comensais), e apenas quatro (15%) ao grupo B₁ (amostras também comensais mais freqüentes em mamíferos não primatas). Pode-se inferir que bactérias comensais poderiam estar adquirindo fatores de virulência e conseqüentemente se adaptando a novos nichos. Comparações entre os genomas de *E. coli* patogênicas e a *E. coli* K12 (não patogênica) revelam que o genoma da primeira contém aproximadamente 25% de DNA genômico a mais do que a não patogênica (KAPER *et al.*, 2004).

5. CONCLUSÃO

Pelo que foi discutido, verificou-se que os fatores de virulência mais evidenciados nos isolados de *E. coli* obtidos de leite mastítico são produção de biofilmes em 100% dos isolados (em diferentes níveis) assim como o fator fimbrial Tipo 1, seguida da resistência ao soro com 96,2%, entre individualmente resistentes e intermediários; produção de enterotoxina do tipo Stb em 55,6%, resistência aos antimicrobianos em 33,33%; adesina fimbrial Cs31A em 29.6% e por último a produção de Verotoxina em 7,4% dos isolados. Entretanto, não houve evidências de associação entre expressão desses fatores entre os isolados de *E. coli* causadoras de mastite.

Porém, considerando os resultados de marcadores moleculares de fatores de virulência, observou-se associação direta entre a presença do gene *vt2* e a produção *in vitro* de VT2. Quanto aos outros marcadores moleculares, não se observou associação entre suas presenças e expressão de fatores de virulência.

A forma com que os fatores de virulência se apresentaram neste experimento reflete sua ocorrência ocasional, com perfis dispersos contrastando com linhagens de *E. coli* entéricas e extraintestinais.

O perfil filogenético dos isolados de *E. coli* em análise genotípica neste estudo demonstrou-se compatível com amostras comensais, revelando a necessidade de estudos que possam tornar elucidativo o grau de adaptabilidade à glândula mamária por parte destes isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUERO, M. E.; ARON, L.; DELUCA, A. G.; TIMMIS, K. N.; CABELLO, F. C. A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 3, p. 740-746, 1984.

ALKAFF, O.; LIEBERMANN, H.; BERGMANN, A. The occurrence and the importance of enterotoxins from strains of *Escherichia coli* from bovine mastitis. **Archiv Für Experimentelle Veterinarmedizin**, v. 45, n. 1, p. 149-154, 1991.

BARROW, P. A.; HILL, A. W. The virulence characteristics of strains of *Escherichia coli* isolated from cases of bovine mastitis in England and Wales. **Veterinary Microbiology**, v. 20, p. 35-48, 1989.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BEAN, A.; WILLIAMSON, J.; CURSONS, R. T. Virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from mastitic milk. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 51, p. 285-287, 2004.

BERTIN, Y.; MARTIN, C.; GIRARDEAU, J. P.; POHL, P.; CONTREPOIS, M. Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. **FEMS Microbiology Letters**, v. 162, p. 235-239, 1998.

BEUTIN, L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 180, p. 167-182, 1991.

BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M. A.; ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R. Close association of Verotoxin (Shiga-like Toxin) Production with Enterohemolysin Production in Strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 11, p. 2559-2564, 1989.

BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M. Enterohaemolysin and Shiga-like toxin genes in *E. coli*. **Veterinary Record**, v. 127, p. 316, 1990.

BEUTIN, L.; PRADA, J.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R.; ØRSKOV, F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E.coli* (EPEC). **Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene [A]**, v. 267, p. 576-588, 1988.

BINGEN, E.; PICARD, N.; BRAHIMI, S.; MATHY, S.; DESJARDINS, P.; ELION, J.; DENAMUR, E. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 642-650, 1998.

BINNS, M. M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R. P. Further Characterization of complement Resistance Conferred on *Escherichia coli* by the Plasmid Genes *traT* of R100 and *iss* of ColV, I-K94. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 2, p. 654-659, 1982.

BLANCO, J.; BLANCO, M.; GONZÁLEZ, E. A.; ALONSO, M. P.; GARABAL, J. I. Comparative evaluation of three tests for the detection of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors (CNF1 and CNF2) using filtrates of cultures treated with mitomycin C. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, p. 311-316, 1990.

BLANCO, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J. E.; RAMOS, J. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 9, p. 1446-1451, 1993.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary Gland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1845-1849, 2001.

BURVENICH, C.; van MERRIS, V.; MEHRZAD, J.; DIEZ-FRAILE, A.; DUCHATEAU, L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Veterinary Research**, v. 34, p. 521-564, 2003.

CAPRIOLI, A.; DONNELI, G.; FALBO, L. A cell division-active protein from *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 118, p. 587-593, 1984.

CAPRIOLI, A.; FALBO, V.; RODA, L. G.; RUGGERI, F. M.; ZONA, C. Partial purification and characterisation of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. **Infection and Immunity**, v. 39, n. 3, p.1300-1306, 1983.

CAPRIOLI, A.; FALBO, V.; RUGGERI, F.M.; BALDASSARRI, L.; BISICCHIA, R.; IPPOLITO, G.; ROMOLI, E.; DONELLI, G. Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extra-intestinal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 146-149, 1987.

CARROLL, E. J.; JAIN, N. C.; SCHALM, O. W. Experimentally induced coliform mastitis: Inoculation of udders with serum-sensitive and serum-resistant organisms. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, p. 1143-1146, 1973.

CASTRO, A. F. P.; YANO, T. Principais doenças entéricas dos bezerros de origem bacteriana. In: CHARLES, T. P.; FURLONG, J. **Diarréia dos bezerros**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1992. p. 1-38.

CAVALIERI, S. J.; BOHACH, G. A.; SNYDER, I. S. *Escherichia coli* α -Hemolysin: Characteristics and probable role in pathogenicity. **Microbiological Reviews**, v. 48, n. 4, p. 326-343, 1984.

CAVALIERI, S. J.; SNYDER, I. S. Cytotoxic activity of partially purified *Escherichia coli* alpha haemolysin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 15, p.11-21, 1982.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555-4558, 2000.

COSTA, E. O. **Mastite**: seus prejuízos em números, 2008. Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/bb0003.htm>>. Acesso em: 24 out. 2008.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1999. p. 422-433.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

De RYCKE, J.; GUILLOT, J. F.; BOIVIN, R. Cytotoxins in non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. **Veterinary Microbiology**, v. 15, p. 137-150, 1987.

De RYCKE, J.; PASSIART, G. Toxic effects for lambs of cytotoxic necrotising factor from *Escherichia coli*. **Research in Veterinary Science**, v. 49, p. 349-354, 1990.

DOBRESCU, L. New biological effect of edema disease principle (*Escherichia coli* neurotoxin) and its use as an in vitro assay for this toxin. **American Journal of Veterinary research**, v. 44, p. 31-34, 1983.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DÖPFER, D.; ALMEIDA, R. A.; LAM, T. J. G. M.; NEDERBRAGT, H.; OLIVER, S. P.; GAASTRA, W. Adhesion and Invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. **Veterinary Microbiology**, v. 74, p. 331-343. 2000.

DOPFER, D.; BARKEMA, H. W.; LAM, T. J. G. M.; SCHUKKEN, Y. H.; GAASTRA, W. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 1, p.80-85, 1999.

DUDGEON, L. S.; PULVERTAFT, R. J. V. On slow lactose fermenting *B. coli* in urinary and intestinal infections. **Journal of Hygiene**, v. 26, p. 285-304, 1927.

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

EVANS, D. G.; EVANS JR., D. J.; DUPONT, H. L. Virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 136, p. 118-23, 1977 (Supplement).

FALBO, V.; FAMIGLIETTI, M.; CAPRIOLI, A. Gene block encoding production of cytotoxic Necrotising Factor 1 and hemolysin in *Escherichia coli* isolates from intestinal infections. **Infection and Immunity**, v. 60, p, 2182-2187, 1992.

FANG, W.; PYÖRALA, S. Mastitis-causing *Escherichia coli*: serum sensitivity and susceptibility to selected antibacterials in milk. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.1, p. 76-82, 1995.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 176 p.

GEARY, S. J.; MARCHLEWICZ, B. A.; FINKELSTEIN, R. A. Comparison of heat-labile enterotoxins from porcine and human strains of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 36, p. 215-220, 1982.

GONZALEZ, E. A.; BLANCO, J. Production of cytotoxin VT in enteropathogenic and non-enteropathogenic *Escherichia coli* strains of porcine origin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 26, p. 127-130, 1985.

GREEN, B. A.; NEIL, R. J.; RUYECHAN, W. T.; HOLMES, R. K. Evidence that a new enterotoxin of *E. coli* wick activates adenyl cyclase in eukaryotic target cells is not plasmid mediated. **Infection and Immunity**, v. 41, p. 383-390, 1983.

GREGORY, D. W. Hemolytic *Escherichia coli* enteritis of weanling pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 141, p. 947-949, 1962.

GROSS, R. J.; ROWE, B. Serotyping of *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. (Ed.) **The virulence of *Escherichia coli***. London: Academic Press, 1985. p. 345-363.

GYLES, C. L.; BARNUM, D. A. A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. **Journal Infection Diseases**, v. 120, p. 419 -426, 1969.

Gyles, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 734-746, 1992.

HERZER, P. J.; INOUE, S.; INOUE, M.; WHITTAM, T. S. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n.11, p. 6175-6181, 1990.

HINTON, M. The ecology of *Escherichia coli* in animals including man with particular reference to drug resistance. **Veterinary Record**, v. 119, p. 420-426, 1986.

HIRSCH, D. C.; WIGER, N. The effect of tetracycline upon the spread of bacterial resistance from calves to man. **Journal of Animal Science**, v. 46, p. 1437-1446, 1978.

HOGAN, J. S.; TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L.; SCHOENBERGER, P.S. Hemagglutination and hemolysis by *Escherichia coli* isolated from bovine intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 11, p. 3126-3131, 1990.

HOLLAND, R. E. Some infectious causes of diarrhoea in young farm animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p. 345-75,1990.

HONDA, T.; TAGA, S.; TAKEDA, Y.; MIWATANI, T. Modified ELEK test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, p. 1-5, 1981.

JOHNSON, G. M.; LEE, D. A.; REGELMANN, W. E.; GRAY, E. D.; PETERS, G.; QUIE, P. G. Interference with granulocyte function by *Staphylococcus epidermidis* slime. **Infection and Immunity**, v. 54, p. 13-20, 1986.

JOHNSTON, D. W.; BRUCE, J.; HILL, J. Incidence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in milk produced in the west of Scotland. **J. Ap. Microbiol.**, v. 54, p. 77-83, 1983.

KAIPAINEN, T.; POHJANVIRTA, T.; SHPIGEL, N. Y.; SHWIMMER, A.; PYORALA, S.; PELKONEN, S. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 85, p. 37-46, 2002.

KAISER, H. Ueber Bakterienhamolysine, im besonderen das Colilysin. **Zeitschrift für Hygiene und. Infektionskrankheiten**, v. 42, p. 118-138, 1903.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBELY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Review Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KAUFFMAN, F. **Enterobacteriaceae**, 2. ed. Copenhagen: Ed. Munksgaard, 1954.

KAUFFMANN, F. Zur serologie der Coli-gruppe. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v. 21, p. 20- 45, 1944.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 18, n. 3, p. 775-779, 1977.

KUNHERT P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 107-117, 2000.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **Journal of Infectious Diseases**, v. 155, p. 377-389, 1987.

LINGGOOD, M. A.; INGRAM, P. L. The role of alpha haemolysin in the virulence of *Escherichia coli* for mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 15, p. 23-30, 1982.

LINTON, K. B.; LEE, P. A.; RICHMOND, M. H.; GILLESPIE, W. A.; ROWLAND, A. J.; BAKER, V. N. Antibiotic resistance and transmissible R-factors in the intestinal coliform flora of healthy adults and children in an urban and a rural community. **Journal of Hygiene**, v. 70, p. 99-104, 1972.

LIPMAN, L. J. A.; De NIJS, A.; GAASTRA, W. Isolation and identification of fimbriae and toxin production by *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 47, p. 1-7, 1995.

LIPMAN, L. J. A.; De NIJS, A.; LAN, T. J. G. M.; GAASTRA, W. Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. **Veterinary Microbiology**, v. 43, p. 13-19, 1994.

LOVELL, R.; REES, T. A. A filterable haemolysin from *Escherichia coli*. **Nature**, London, v. 188, p. 755-756, 1960.

LUDWIG, A.; GOEBEL, W. Haemolysins of *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. **Escherichia coli: mechanisms of virulence**. United Kingdom: Cambridge University Press, 1997. p. 281-329.

LUDWIG, A.; JARCHAU, T.; BENZ, R.; GOEBEL, W. The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (Hly A) is responsible for its Ca²⁺-dependent binding to erythrocytes. **Molecular and General Genetics**, v. 214, p. 553-561, 1988.

MAINIL, J. G.; JACQUEMIN, E.; POHL, P.; FAIRBROTHER, J. M.; ANSUINI, A.; Le BOUGUÉNEC, Ch.; BALL, H. J.; De RYCKE, J.; OSWALD, E. Comparison of Necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from farm animals and from humans. **Veterinary Microbiology**, v. 70, p. 123-135, 1999.

McLAREN, I.; WRAY, C. Another animal *E. coli* cytopathic factor. **Veterinary Record**, v. 119, p. 576-577, 1986.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FRINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections ? **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 398-407, 2006.

MENARD, L. P.; DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* Heat-stable enterotoxin 1 EAST1: A new toxin with an old twist. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 43-60, 2002.

NEMETH, J.; MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. In vitro comparison of bovine mastitis and faecal *Escherichia coli* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 231-238, 1994.

NEMETH, J.; MUCKLE, C. A.; LO, R. Y. Serum resistance and the *traT* gene in bovine mastitis-causing *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 28, p. 343-351, 1991.

NICAUD, J. M.; MACKMAN, N.; GRAY, I.; HOLLAND, I. B. Regulation of hemolysin synthesis in *E. coli* determined by HLY genes of human origin. **Molecular and General Genetics**, v. 199, p.111-116, 1985.

O'BRIEN, A. D.; LaVECK, G. D.; THOMPSON, M. R.; FORMAL, S. B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 146, p. 763-769, 1982.

ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F. Serology of *Escherichia coli* fimbriae. **Progress in Allergy**, v. 33, p. 80-105, 1983.

ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; JANN, B.; JANN, K. Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, p. 667-710, 1977.

OSEK, J. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin

markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhoea. **Veterinary Microbiology**, v. 91, p. 65-72, 2003

OSWALD, E.; De RYCKE, J. A single protein of 110 kDa is associated with the multinucleating and necrotizing activity coded by the Vir plasmid of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 66, p. 278-284, 1990.

PARRY, S. H.; ABRAHAM, S. N.; SUSSMAN, M. The biological and serological properties of adhesion determinants of *E. coli* isolated from urinary tract infections. In: SCHULTE-WISSERMANN, H. (Ed.). **Clinical, bacteriological and immunological aspects of urinary tract infection in children**. Stuttgart: Thieme, 1982. p. 113-25.

PASS, M. A.; ODEDRA, R.; BATT, R. M. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 2001-2004, 2000.

PELKONEN, S.; FINNE, J. A rapid turbidimetric assay for the study of serum sensitivity of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 42, p. 53-57, 1987.

PICKETT, C. L.; TWIDDY, E. M.; BELISLE, B. W.; HOLMES, R. K. Cloning of genes that encode a new heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 165, p. 348-352, 1986.

POHL, P.; OSWALD, E.; van MUYLEM, K.; JACQUEMIN, E.; LINTERMANS, P.; MAINIL, J. *Escherichia coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. **Veterinary research**, v. 24, p. 311-315, 1993.

PRADA, J.; BALJER, G.; De RYCKE, J.; STEINRÜCK, H.; ZIMMERMANN, S.; STEPHAN, R.; BEUTIN, L. Characteristics of α -haemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastro-enteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 29, p. 59-73, 1991.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clinica Veterinária, um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9. ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002. 1.770 p.

REED, B. A.; GRIVETTI, L. E. Controlling on-farm inventories of bulk-tank raw milk - an opportunity to protect public health. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2988-2991, 2000.

RIBEIRO, M. G. **Fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina clínica e subclínica**. 2001. 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

RIBEIRO, M. G., COSTA, E. O.; LEITE, D. S.; LANGONI, H.; GARINO JUNIOR, F.; VICTORIA, C.; LISTONI, F. J. P. Fatores de Virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5, n. 5, p. 724-731, 2006.

SALVADORI, M. R.; VALADARES, G. F.; LEITE, D. S.; BLANCO, J.; YANO, T. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 230-235, 2003.

SANCHEZ-CARLO, V.; McDONALD, J. S.; PACKER, R. A. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from cows with acute mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 9, p. 1775-1777, 1984.

SANDRINI, C. N. M.; PEREIRA, M. A.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 175-182, 2007.

SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N. A. Genus I. *Escherichia*. In: **Bergey's manual[®] of systematic bacteriology**. 2. ed., 2005. p. 607-625.

SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R.; ROWE, B. Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157. **Lancet**, v. 2, p. 885-886, 1985.

SMITH, H. R.; SCOTLAND, S. M.; WILLSHAW, G. A.; WRAY, C.; McLAREN, I. M.; CHEASTY, T.; ROWE, B. Vero cytotoxin production and presence of VT genes in *Escherichia coli* strains of animal origin. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 829-834, 1988.

SMITH, H. W. The haemolysins of *Escherichia coli*. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 85, p. 197-211, 1963.

SMITH, H. W.; GREEN, P.; PARSELL, Z. Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: transfer by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 3121-3137, 1983.

SMITH, H. W.; HALLS, S. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 93, p. 499-529, 1967.

SMITH, H. W., HUGGINS, M. B. Further observations on the association of the colicine V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. **Journal of General Microbiology**, v. 92, p. 335-350, 1976.

SMITH, H. W. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-mediated toxin and a

plasmid-controlled lethal character closely associated with, or identical with, or identical with, colicine V. **Journal of General Microbiology**, v. 83, p. 95-111, 1974.

SNYDER, I. S.; ZWADYK, P. Some factors affecting production and assay of *Escherichia coli* haemolysins. **Journal of General Microbiology**, v. 55, p. 139-143, 1969.

SOOGARD, H. In vitro antibiotic susceptibility of *E. coli* isolated from acute and chronic bovine mastitis with reference to clinical efficacy. **Nordish Veterinary Medicine**, v. 34, p. 248-254, 1982.

STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 428-432, 2004.

STEPHAN, R.; RÜSCH, P. Aktuelle Resistenzsituation von *Escherichia coli*-Stämmen aus bovinen mastitismilchproben. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 139, p. 495-499, 1997.

STUBER, K.; FREY, J.; BURNENS, A. P.; KUHNERT, P. Detection of type III secretion genes as a general indicator of bacterial virulence. **Molecular and Cellular Probes**, v. 17, p. 25-32, 2003.

SUSSMAN, M. ***Escherichia coli*: mechanisms of virulence**. UK: Cambridge University press, 1997. 639 p.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. Ed. Atheneu, 1996. 792 p.

TAYLOR, P. W. Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 47, n. 1, p. 46-83, 1983.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. Revista e atualizada. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005.

VALENTE, C.; CARDARAS, P.; CIORBA, A.; TESEI, B. Studies on virulence factors of *Escherichia coli* isolated from cows with acute mastitis. **Archivio Veterinario Italiano**, v. 39, n. 5-6, p. 254-260, 1988.

van HOUTT, R.; MICHIELS, G. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 626-633, 2005.

WAALWIJK, C.; MacLAREN, D. M.; GRAAFF, J. In vivo function of hemolysin in the nephropathogenicity of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 42, p. 245-249, 1983.

WELLS, S. J.; OTT, S. L.; HILLBERG SEITZINGER. A. Key health issues for dairy cattle - New and old. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3029-3035, 1998.

WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F. B.; ELLIS, R. P.; MAGNUSON, R. J. *Escherichia coli* isolates serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 9, p. 3408-3412, 2006.

WRIGHT, S. D.; LEVINE, R. P. How complement kills *E. coli*. I. Location of the lethal lesion. **The Journal of Immunology**, v. 127, p. 1146 -1151, 1981.

YANO, T.; TAMASHIRO, W. M.S. C.; GARCIA, M.; CASTRO, A. F. P. Detecção de Vero citotoxina (VT) em amostras de *Escherichia coli* isoladas de Bezerros com diarréia. **Revista de Microbiologia**, v. 17, n. 4, p. 339-341, 1986.