

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

MONITORAMENTO DA DISPERSÃO DE CEPAS DE *Escherichia coli*
EM AMBIENTE DE PRODUÇÃO LEITEIRA

Greiciane França Bronzato de Almeida

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MONITORAMENTO DA DISPERSÃO DE CEPAS DE *Escherichia coli*
EM AMBIENTE DE PRODUÇÃO LEITEIRA

Greiciane França Bronzato de Almeida

Sob a Orientação da Professora

Shana de Mattos de Oliveira Coelho

e Co-orientação da Professora

Miliane Moreira Soares de Souza

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ

Fevereiro 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A447m Almeida, Greiciane França Bronzato de, 1987-
Monitoramento da dispersão de cepas de Escherichia coli em ambiente de produção leiteira / Greiciane França Bronzato de Almeida. - 2018.
111 f.: il.

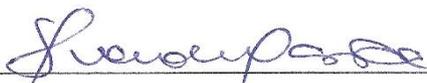
Orientadora: Shana de Mattos de Oliveira Coelho.
Coorientadora: Miliane Moreira Soares de Souza .
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias , 2018.

1. E. coli. 2. Mastite bovina. 3. Perfil de virulência . 4. Tipagem molecular. I. Coelho, Shana de Mattos de Oliveira , 1980-, orient. II. Souza , Miliane Moreira Soares de , 1970-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias . IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

GREICIANE FRANÇA BRONZATO DE ALMEIDA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.



Shana de Mattos de Oliveira Coelho. Dsc. UFRRJ
(Orientadora)



Irene da Silva Coelho. Dsc. UFRRJ



Bruno Rocha Pribul. Dsc. FIOCRUZ



Adriana Hamond Regua Mangia. Dsc. FIOCRUZ



Luc Felicianus Marie Rouws. Dsc. EMBRAPA-Agrobiologia

Peça a Deus que abençoe os seus planos e eles darão certo.

Provérbios 16:3

AGRADECIMENTOS

Não há palavras suficientes para agradecer ao Todo Poderoso Deus, sentir e estar na Sua presença foi incrível e imprescindível para essa longa jornada da minha vida. Quantas foram as batalhas pessoais enfrentadas durante esse doutorado, no qual pensava que não fosse aguentar, mas posso ter certeza que só cheguei ao final porque o Senhor esteve comigo. Foi tremendo o agir de Deus! Sinceramente, não existe outra explicação para tudo que foi vivido durante esses quatro anos! Até aqui “me” ajudou o Senhor! 1Samuel 7:12. Obrigada!

Ao meu pai Maximo Bronzato, que vivenciou comigo cada etapa dessa fase, que esteve ao meu lado me empurrando para frente o tempo todo, que vibrou junto a cada experimento feito, a cada trecho de tese escrita, a cada artigo publicado, a cada vitória conquistada mesmo sem conhecer essa vida acadêmica, guiando-se apenas pelo meu sorriso. A minha mãe Sandra França que fez o possível para me ajudar, mesmo diante das dificuldades e sem saber expressar esse sentimento, eu sempre soube que esteve comigo, compartilhando de cada detalhe.

A minha irmã Franciane Bronzato e ao meu irmão Max Bronzato pelo carinho e compreensão pelos momentos que me ausentei e por estarem de alguma forma vivenciando este momento comigo.

A minha avó Hirany França, com os seus 93 anos, talvez ela nem saiba, mas aquele simples gesto de arrumar minha cama quando eu acordava as cinco horas da manhã para ir à Rural, me ajudava de maneira incrível e me fazia muito feliz.

As minhas amigas Flavia Peres e Ana Claudia Melo, por estarem ao meu lado, me incentivando a todo momento e pela paciência pelos momentos que não pude estar presente. E as minhas queridas amigas paranaenses Ana Carolina Jaskulski, Amanda Haisi e Ana Helen Baudisch, o qual tive o imenso prazer de conhecê-las durante a minha permanência na Argentina e conviver como uma família em momentos tão especiais.

A todos da querida célula Torre Forte, que esteve intercedendo pela minha vida em orações e pelo cuidado a cada passo dessa jornada.

A minha querida orientadora Shana de Mattos de Oliveira Coelho, a qual eu sonhava pela sua orientação desde a graduação e eu estava certa! Foi uma parceria incrível! Sou muito grata pelos seus ensinamentos, pelas mãos estendidas nas horas que eu mais precisei e por ter me apresentado o melhor de mim hoje! Agradeço a Deus por todo o cuidado dEle conosco e por fazer dessa relação orientada/orientadora uma grande amizade!

A professora Irene da Silva Coelho por todo carinho, calma conosco e por toda a ajuda concedida com a biologia molecular, você é a peça chave para nossa pesquisa dentro do Labac-Vet. A professora Miliane Moreira Soares de Souza pela oportunidade de estar a quase 8 anos dentro desse laboratório aprendendo sobre o fantástico mundo das bactérias!

Ao Ramon Loureiro Pimenta pela amizade que veio por compartilharmos situações tão parecidas e pela ajuda mutua a cada isolamento e PCRs. Por dividirmos conhecimento profissional e de vida quando passávamos horas conversando. A Marisol Alvin Gomez no qual eu tive o prazer de me aproximar muito nesse último ano e construir uma amizade sincera e muito especial, regada de ensinamentos, ajuda e muita alegria. Nós três, conhecidos como os sobreviventes da Pós (nosso apelido carinhoso e de encorajamento), formamos uma parceria fundamental para chegarmos até aqui e juntos vamos concluir mais essa etapa da vida!

Ao Samuel Passos e Bianca Soares por toda ajuda concedida para análise dos resultados do MLST, sem vocês não teria conseguido esses dados tão importantes!

Aos amigos feitos ao longo dessa jornada, Naiara Rodrigues, Gabrielli Santiago, Dayanne Mello, Bruno Carvalho e Cassia Motta. Foram muito e talvez eu esqueça de alguém, mas todos em algum momento foram importantes para mim, porque a base do nosso laboratório é a ajuda que concedemos uns aos outros. E aos amigos da residência em Microbiologia da UFRRJ e todo o departamento (DMIV) pela amizade e carinho.

Aos estagiários do Labac-Vet por todo apoio e auxílio nas etapas de experimentação.

As professoras Mirta Lasagno e Elina Reinoso, bem como as doutorandas e amigas Melina Moliva e Ivana Montironi por me receberem carinhosamente na Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, onde tive o prazer de estar por 5 meses aprendendo novas técnicas e até mesmo nova cultura. E a doutoranda Paula Asurmendi por executar parte da técnica de PCR realizada para o MLST durante seu doutorado sanduíche no Brasil.

Ao laboratório de Referência de Enteroinfecções Bacterianas da FIOCRUZ por toda ajuda concedida para a confecção dessa tese.

A EMBRAPA Agrobiologia por permitir a utilização do programa Bionumerics, sendo de suma importante para os resultados desse trabalho.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, principalmente ao secretário Arthur Santiago por não medir esforços em nos ajudar.

E por fim a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

A todos vocês eu deixo essa mensagem em forma de agradecimento: “Aqueles que passam por nós, não vão só, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.” O pequeno príncipe.

BIOGRAFIA

Greiciane França Bronzato de Almeida, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Severino Sombra, no ano de 2007, diplomando-se em agosto de 2011.

Durante a graduação, foi monitora de microbiologia para o curso de medicina veterinária nesta instituição e estagiária no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), do período de 2010 a 2012, participando de projetos na área de identificação de *Vibrio* spp. a partir amostras de mexilhões sob a orientação da professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza.

Em 2012, foi aprovada no processo de seleção do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado na UFRRJ também sob a orientação da professora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza.

Ingressou no doutorado em 2014 pelo mesmo programa de Pós-Graduação, agora sob a orientação da professora doutora Shana de Mattos de Oliveira Coelho.

Realizou doutorado sanduiche na Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), Argentina, onde realizou parte do seu projeto de pesquisa no laboratório de genética sob a orientação das professoras doutoras Mirta Lasagno e Elina Reinoso em um período de 5 meses, retornando ao Brasil com importantes resultados para finalização do seu doutoramento.

RESUMO

ALMEIDA, Greiciane França Bronzato. **Monitoramento da dispersão de cepas de *Escherichia coli* em ambiente de produção leiteira.** 111p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A atividade leiteira tem sido de grande importância para economia em todo o mundo e, por esse motivo, cada vez mais os produtores têm buscado melhorias na qualidade do leite, focando no controle de enfermidades que acometem o rebanho, em especial da mastite bovina. A mastite ambiental pode gerar grandes impactos na bovinocultura leiteira, sendo esta comumente ocasionada por microrganismos como *Escherichia coli*. Esta espécie bacteriana possui heterogeneidade genética e população caracterizada por cepas geneticamente diversificadas, além da capacidade de persistir no ambiente de produção por tempo prolongado. Frente a esse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as relações clonais de *E. coli* em ambiente de produção leiteira através das técnicas de tipagem molecular *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST), para isso 444 amostras distribuídas entre leite, fezes, água e cadeia produtiva oriundas de uma fazenda localizada no município de Barra do Piraí no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, foram submetidas a testes bioquímicos e a técnica de MALDI-TOF MS para identificação bacteriana. Além disso, as amostras de água (poço, açude, bebedouro, torneira e riacho) foram submetidas ao teste do Número Mais Provável (NMP) para avaliação de coliforme totais e termotolerantes no qual apresentaram padrões de potabilidade superiores aos estipulados pelo Ministério da Saúde. De 183 enterobactérias identificadas, 152 (83%) foram confirmadas através de ambas as metodologias como *E. coli*. Destas, nove representantes tiveram o gene *gyrB* sequenciado para confirmação molecular da espécie apresentando até 99% de máxima identidade quando as sequências foram comparadas com as sequências do banco de dados NCBI. Posteriormente, todas as 152 cepas de *E. coli* foram submetidas fenotipicamente a produção de biofilme e detecção de genes de virulência, onde foi possível observar que 41,44% (63/152) de cepas foram produtoras de biofilme, sendo 37,5% (57/152) fraca produtoras, 1,31% (2/152) produtoras moderadas e 2,63% (4/152) fortes produtoras. Além disso, foi possível detectar 92,1% (140/152) de cepas positivas para o gene *fimH*; 88,8% (135/152) para o gene *csxA*, 29,6% (45/152) para o gene *flu* (que são genes relacionados ao biofilme) e 13,1% (20/152) positivas para o gene *eaeA*; 7,2% (11/152) para o gene *LT* e 2,6% (4/152) para o gene *stxI*. Nenhuma cepa foi positiva para os genes *stxII*, *ST*, *ial* e *eagg*. A partir destes resultados, 18 perfis foram estabelecidos com o propósito de selecionar 30 cepas que foram processadas no laboratório de genética da Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, através da técnica PFGE, onde foi possível observar uma elevada variabilidade genética. As cepas que apresentaram de 95% a 100% de similaridade (n=10) foram sequenciadas, a fim de estabelecer uma relação clonal entre elas através da técnica de MLST, que gerou oito tipos diferentes de ST, sendo o ST164 e o ST1308 os que estabeleceram possíveis relações clonais entre cepas. Além disso, foi observado um novo tipo de sequência (ST) que deverá ser submetido a um sequenciamento de nova geração, e então ser enviado ao curador do MLST para que seja gerado um novo número de ST e depositado no banco de dados do esquema. Ao realizar buscas tanto no banco de dados quanto na literatura, não foram encontrados no Brasil relatos sobre os STs (ST5, ST164, ST165 e ST1308) estudados provenientes de cepas de *E. coli* bovinas, levando ao entendimento de que este trabalho é o primeiro relato no país.

Palavras-chave: *E. coli*, Mastite bovina, perfil de virulência, tipagem molecular

ABSTRACT

ALMEIDA, Greiciane França Bronzato. **Monitoring the dispersion of *Escherichia coli* strains in a dairy environment.** 111p. Thesis (PhD in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Dairy farming has been of great importance for the world economy and for such reason producers have, more and more, sought improvements in milk quality, focusing on controlling diseases that affect the cattle such as bovine mastitis. Environmental mastitis, which is commonly caused by microorganisms such as *Escherichia coli*, can generate great impacts on dairy cattle. This bacterial species has genetic heterogeneity and population characterized by genetically diverse strains, besides the capacity to persist in production environment for an extended period. In this context, the present study aims to evaluate the clonal relationships of *E. coli* in a milk production environment through the molecular typing techniques Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST). For this purpose, 444 samples distributed between milk, faeces, water and the production chain from a farm located in the municipality of Barra do Piraí, in the State of Rio de Janeiro, Brazil, were subjected to biochemical tests and the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) technique for bacterial identification. In addition, water samples (well, pond, drinking fountain, faucet and creek) were subjected to the Most Probable Number (MPN) test for total and thermotolerant coliform evaluation, in which they presented potability standards higher than those stipulated by the Ministry of Health. Out of 183 identified enterobacteria, 152 (83%) were confirmed by both methodologies as being *E. coli*. Out of these, nine representatives had the *gyrB* gene sequenced for molecular confirmation of the species exhibiting up to 99% maximum identity when the sequences were compared to the NCBI database sequences. Later, all 152 *E. coli* strains were phenotypically subjected to biofilm production and virulence genes detection, where it was possible to observe that 41.44% (63/152) of strains were biofilm producers, being 37.5% (57/152) weak producers, 1.31% (2/152) of moderate producers and 2.63% (4/152) strong producers. Moreover, 92.1% (140/152) of *fimH* gene positive strains could be detected, 88.8% (135/152) for the *csgA* gene, 29.6% (45/152) for the *flu* gene (which are biofilm-related genes) and 13.1% (20/152) positive for the *eaeA* gene; 7.2% (11/152) for the *LT* gene and 2.6% (4/152) for the *stxI* gene. No strain was positive for the *stxII*, *ST*, *ial* and *eagg* genes. From these results, 18 profiles were established with the purpose of selecting 30 strains that were processed in the Laboratory of Genetics of the National University of Río Cuarto, Argentina, through the PFGE technique, where it was possible to observe high genetic variability. Strains that presented from 95% to 100% of similarity ($n = 10$) were sequenced in order to establish a clonal relationship between them through the MLST technique that generated eight different ST types, with ST164 and ST1308 being the ones that established possible clonal relationships between strains. Furthermore, a new type of sequence (ST) was observed, one which should be subjected to a new generation sequencing and then sent to the MLST healer to generate a new ST number and deposited in the schema database. When researching the database as well as the literature, no ST reports (ST5, ST164, ST165 and ST1308) derived from bovine *E. coli* strains were found in Brazil, leading to the understanding that this work is the very first report in such country.

Key words: *E. coli*, bovine mastitis, virulence profile, molecular typing

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

BHI – Infusão de Cérebro e Coração

CC – Complexo clonal

CCS – Contagem de Células Somáticas

CDC – *Centers for Disease Control*

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

CMT – Califórnia Mastitis Test

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EMB – Eosina Azul de Metileno

EAEC – *Enteraggative Escherichia coli*

EC – Caldo *Escherichia coli*

E. coli – *Escherichia coli*

EIEC – *Enteroinvasive Escherichia coli*

EHEC – *Enterohaemorrhagic Escherichia coli*

ESALQ-USP – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo

EPEC – *Enteropathogenic Escherichia coli*

ETEC – *Enterotoxigenic Escherichia coli*

ExPEC – *Extra-intestinal Escherichia coli*

FF - Fatores *fitness*

h – Horas

IN – Instrução normativa

KCl – Cloreto de potássio

LBVB – Caldo Lactose Bile Verde Brilhante

LST – Caldo Lauril Sulfato Triptose

MAEC – *Mastitis-associated Escherichia coli*

MALDI-TOF - Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz

MgCl₂– Cloreto de magnésio

MLEE – *Multilocus Enzyme Electrophoresis*

MLST – *Multilocus Sequence Typing*

MPEC –*Mammary pathogenic Escherichia coli*

mm – Milímetros

mM – Milimolar

MS - Espectrometria de massa

nm - Nanômetros

NaCl – Cloreto de sódio

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NST – Novo ST

pb – Pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

pH – Potencial hidrogeniônico

pmol – picomol

PT – Pulsotipo

ST – Tipo de sequência

UI – Unidade internacional

V – Volts

VTEC – *verocytotoxin-producing Escherichia coli*

µg – Microgramas

µl – Microlitro

°C – Graus Celsius

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	Determinação de cepas de <i>E. coli</i> em grupos filogenéticos através da PCR multiplex.	7
Figura 2	Mapa do estado do Rio de Janeiro. Em destaque a cidade de Barra do Piraí onde foram realizadas as coletas em estudo.	21
Figura 3	Diagnóstico da mastite através do <i>Califónia Mastitis Test</i> (CMT).	22
Figura 4	Isolamento primário em meios de cultura seletivo. A - ágar Eosina Azul de Metileno; B - ágar Mac Conkey.	25
Figura 5	Meios de cultura utilizados na determinação do Número Mais Provável. A. Resultado positivo com turvação e presença de bolha no tubo de Durhan. B. Controle negativo.	26
Figura 6	Provas bioquímicas com resultado positivo realizadas para identificação de <i>E. coli</i> em amostras de leite, fezes, água e cadeia produtiva. A. Kligler. B. Citrato Simmons. C. SIM. D. Vermelho de Metila. E. Vouges-Proskauer.	28
Figura 7	Curva de lactação de uma vaca caracterizando o perfil de inflamação de curta duração (A) ou de inflamação de longa duração (B). A área marcada em cinza ilustra a perda de produção devido à infecção intramamária. As setas vermelhas indicam o início da infecção intramamária clínica causada por <i>E. coli</i> .	40
Figura 8	Técnica da microplaca revelando a produção de biofilme, por <i>E. coli</i> isoladas de mastite bovina A - cepa controle, B - cepa forte produtora, B - cepa produtora moderada, C - cepa fraca produtora, D - cepa não produtora.	41
Figura 9	Padrão de bandas em gel de agarose obtido através da eletroforese de campo pulsante. M – marcador (<i>Salmonella entérica</i> subespécie <i>entérica</i> sorotipo Braenderup H9812).	46
Figura 10	Dendograma formado a partir de 30 cepas de <i>E. coli</i> eleitas a partir dos perfis de virulência gerados. A escala indica níveis de similaridade dentro deste conjunto de isolados com base na digestão de restrição enzimática <i>Xba</i> I do DNA bacteriano total. A coluna amostras mostra a designação isolada; A coluna PT, representam os pulsotipos* gerados a partir do PFGE; A coluna fonte indica o ambiente de isolamento de bactérias; animais e locais os animais e locais pertencentes ao estudo; a coluna estações representa as estações climáticas onde foram	48

coletadas; as colunas subsequentes descrevem os resultados da reação em cadeia da polimerase para genes de virulência testados, com presença indicada em preto e ausência indicada em branco.

Figura 11 (A) Gráfico de torta representando os tipos de sequência entre as cepas *E. coli* avaliadas no estudo. (B) aplicação do algoritmo PHILOVIZ, mostrando a estrutura populacional, retratando a distribuição clonal das cepas de *E. coli*. Cada tipo de sequência é representado por um círculo, e dentro de cada círculo estão inseridos os nomes das cepas representantes. As cepas que apresentaram variação de um único *locus* foram demonstrados com uma única cor (azul claro) e as cepas que apresentaram combinações exatas foram representadas por um único círculo azul escuro. **51**

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág
Quadro 1 Quadro extraído do programa Bruker Daltonik MALDI apresentando o significado dos valores em relação ao <i>score</i> obtido na amostra.	29
Quadro 2 Classificação da produção de biofilme pelo método da microplaca.	30
Quadro 3 Descrição dos <i>primers</i> utilizados para amplificação da região 16S rDNA bacteriano e do gene <i>gyrB</i> para as estirpes de Enterobactérias.	32
Quadro 4 Descrição das sequencias de <i>primers</i> para amplificação de genes de virulência utilizados para formação de perfis genéticos.	33
Quadro5 Descrição das sequencias de <i>primers</i> para amplificação de sete genes <i>housekeeping</i> utilizados na técnica MLST.	35

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág
Tabela 1 Média do Número Mais Provável de Coliformes Totais e Termotolerantes das amostras de água coletadas nas quatro estações.	37
Tabela 2 Resultados do sequenciamento do gene <i>gyrB</i> em <i>E. coli</i> identificadas pelos testes fenotípicos e MALDI-TOF MS	39
Tabela 3 Percentual de produção de biofilme por amostra coleta	41
Tabela 4 Perfil alélico gerado através da técnica de MLST em cepas de <i>E. coli</i> de diferentes origens da cadeia produtiva do leite	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág
Gráfico 1 Percentual de Enterobactérias encontradas nas amostras estudadas.	37
Gráfico 2 Percentual de <i>E. coli</i> dentro do ambiente de produção leiteira	38
Gráfico 3 Percentual dos genes de virulência avaliados	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Panorama da produção leiteira no Brasil	3
2.2	Mastite bovina associada à <i>Escherichia coli</i>	4
2.3	Caracterização da <i>Escherichia coli</i>	5
2.3.1	Caracterização antigênica	6
2.3.2	Classificação filogenética de <i>Escherichia coli</i>	6
2.3.3	Classificação em patótipos	7
2.4	Dispersão de <i>Escherichia coli</i> no ambiente de produção leiteira	10
2.5	Formação de biofilme por <i>Escherichia coli</i>	11
2.6	MALDI TOF MS como uma ferramenta para confirmação da espécie	14
2.7	Técnicas de tipagem molecular	15
2.6.1	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE)	17
2.6.2	<i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	18
3	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivo Geral	20
3.2	Objetivos Específicos	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Declaração de Ética	21
4.2	Local de Coleta	21
4.3	Amostragem	21
4.4	Diagnóstico da mastite bovina	22
4.5	Coleta das amostra de leite e fezes de vacas em lactação	23
4.6	Coleta das amostras da linha de ordenha	23
4.7	Coleta das amostras de água	23
4.8	Cepas utilizadas como controle	24
4.9	Isolamento bacteriano e testes microbiológicos presuntivos	24
4.9.1	Leite e fezes	24

4.9.2	Água	25
4.10	Identificação de Enterobactérias	26
4.10.1	Diagnóstico presuntivo através do meio Kligler Iron Agar	26
4.10.2	Avaliação do perfil bioquímico	27
4.10.3	Identificação das Enterobacterias por MALDI-TOF MS	28
4.10.4	Teste fenotípico para avaliação da produção de biofilme em microplaca	29
4.10.5	Sorotipagem	30
4.11	Detecção genotípica	30
4.11.1	Extração de DNA total bacteriano	30
4.11.2	Amplificação do gene 16S rDNA e do gene <i>gyrB</i> por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	31
4.11.3	Detecção de genes de virulência para formação de perfis	32
4.11.4	Amostragem referente às análises desenvolvidas na Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC)	33
4.11.4.1	Preparo da célula para <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE)	33
4.11.4.2	Digestão de DNA genômico em blocos de Agarose	34
4.11.4.3	Eletroforese e coloração do gel de agarose	34
4.11.4.4	Análise dos perfis eletroforéticos	35
4.10.4.4	Análise baseada em <i>Multilocus Sequence Typing</i>	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Identificação de <i>Escherichia coli</i>	37
5.2.	Produção de biofilme e avaliação do perfil de virulência de <i>E. coli</i> através da técnica de PCR.	340
5.3	Análise através da técnica PFGE	46
5.4	Análise através da técnica MLST	50
5.5	Análise dos perfis genéticos gerados pelas diferentes técnicas de tipagem molecular	55
6	CONCLUSÃO	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	ANEXOS	82

Anexo 1	Caracterização dos animais estudados	82
Anexo 2	Perfil de virulência gerado para selecionar 30 cepas de <i>E. coli</i> para a técnica de PFGE realizada na UNRC – Argentina	85
Anexo 3	Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes em amostras de água coletadas em cinco pontos distintos da propriedade de acordo com as estações do ano.	86
Anexo 4	Dados específicos das cepas estudadas	87

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, ocupando a quinta posição do *ranking* mundial (USDA, 2017). O agronegócio de leite atinge uma média de 36 milhões de litros anualmente e dentre as regiões produtoras, o Sudeste vem se sobressaindo, sendo o estado de Minas Gerais responsável pelo maior percentual de produção (MAIA et al., 2013).

Considerando que o leite é um dos alimentos mais completos devido ao seu elevado valor nutritivo, em especial como fonte de proteína, sais minerais, gordura e vitaminas, as melhorias nas áreas de nutrição, genética, reprodução e controle sanitário dos animais são extremamente importantes para manutenção da qualidade deste produto (NIELSEN, 2009).

Um das grandes preocupações da indústria leiteira é o controle efetivo de bactérias patogênicas, como a *Escherichia coli* O157:H7, que pode ser transmitida por meio do leite e seus subprodutos, uma vez que esta bactéria, pode estar presente durante o processo de ordenha por ser normal do trato gastrointestinal de bovinos. Muitos sorotipos de *E. coli* podem causar infecções oportunistas quando localizadas em ambientes extra-intestinais, como na glândula mamária e trato urinário (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae, no qual faz parte da microbiota intestinal dos mamíferos como comensal, porém algumas estirpes estão associadas a patologias intestinais e extraintestinais no homem e animais (NATARO & KAPER, 1998; CROXEN & FINLAY, 2010). Esta bactéria pode ser classificada através da sorotipagem de acordo com a presença de diferentes antígenos somáticos, capsulares e fimbriais. No entanto, a tipificação sorológica da bactéria é limitada, pois somente algumas cepas apresentam antissoros disponíveis para sua classificação (BERTSCHINGER & FAIRBROTHER, 1999). Além disso, este microrganismo apresenta diversos patótipos, que são caracterizados pela presença de diferentes fatores de virulência como exotoxinas, hemolisinas, sideróforos, adesinas e endotoxina presente na parede celular, no quais são codificados por genes específicos (TENG et al., 2004).

Outro fator de virulência pode estar associado a esta bactéria devido a sua capacidade de formar biofilme, um importante mecanismo de proteção e resistência a antimicrobianos, no qual permite a adesão e interação da bactéria com superfícies vivas ou inertes, iniciando assim a reprodução celular (BURVENICH et al., 2007). *E. coli* K-12 por exemplo, utiliza várias estruturas de superfície, incluindo fímbrias de tipo 1, fímbria curli e antígeno 43 para adesão e colonização de superfícies inertes (KJÆRGAARD et al., 2000a; GOPHNA et al., 2002; LI et al., 2007).

De acordo com esse contexto, muitos pesquisadores têm utilizado técnicas de tipagem molecular afim de melhorar a compreensão sobre surgimento e dispersão dessas cepas virulentas, bem como seus reservatórios, uma vez que o conceito básico de tipagem molecular propõe que amostras bacterianas epidemiologicamente relacionadas possuam um percussor comum. A técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) -fundamentada na atuação da enzima de restrição no DNA bacteriano e *Multilocus Sequence Typing* (MLST), que se baseia na sequência de DNA de genes *housekeeping*, têm sido utilizadas para caracterizar uma série de bactérias patogênicas (NALLAPAREDDY et al., 2002).

Em relação às análises filogenéticas, o MLST tem sido frequentemente comparado com o PFGE (NEMOY et al, 2005; HARBOTTLE, 2006). Porém estas comparações ainda são controversas, visto que existem outros estudos que demonstram a superioridade ou igual capacidade de resolução do PFGE (LEOMIL et al, 2005; JI et al, 2006).

Desta forma, o presente projeto visou avaliar a diversidade e as relações clonais de *E. coli* em ambiente de produção leiteira através das técnicas de tipagem PFGE e MLST permitindo um melhor entendimento sobre a dinâmica da espécie no ambiente estudado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Panorama da produção leiteira no Brasil

O sistema de produção leiteira vem ocupando um espaço de destaque na economia mundial, onde aproximadamente 150 milhões de lares em todo o mundo estão envolvidos nesse sistema, de acordo com as informações da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* -órgão da ONU- (2016), sendo também um dos sistemas de produção mais expressivos do Brasil, principalmente pela sua importância social. A atividade leiteira é praticada em todo país, gerando milhões de empregos diretos na produção primária e agregando mais de seis bilhões de reais ao valor da produção agropecuária nacional (MULLER, 2002).

Os países como o maior volume de leite no mundo, igualmente encontram-se entre os maiores consumidores. Em 2017, os Estados Unidos foi o maior produtor de leite, com 97,8 milhões de litros produzidos, a Índia encontrou-se em segundo lugar com uma produção de 72 milhões de litros, a China apareceu ocupando a terceira posição com 35,5 milhões de litros e a Rússia no quarto lugar com 30,6 milhões. O Brasil manteve-se na quinta posição entre os países que mais produzem leite em nível mundial, registrando uma produção de 23,5 milhões de litros de leite de acordo com dados estabelecidos pelo USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) em 2017.

Segundo os dados da Estatística da Produção Pecuária, elaborada pelo IBGE (2017), o Brasil obteve aquisição de 313,96 milhões de litros de leite a mais em nível nacional no 3º trimestre de 2017, representando um aumento de 5,4% em relação à registrada no mesmo trimestre de 2016. Os aumentos mais intensos foram verificados em Santa Catarina (+122,75 milhões de litros), Rio Grande do Sul (+71,44 milhões de litros), São Paulo (+64,44 milhões de litros) e Goiás (+31,03 milhões de litros). A maior redução ocorreu no Paraná (-38,65 milhões de litros).

O estado de Minas Gerais, situado na região sudeste do país mantém-se na liderança como produtor de leite no Brasil, com 24% da aquisição nacional, seguido pelo Rio Grande do Sul (15,5%) e Santa Catarina (13,2%). O estado do Rio de Janeiro ocupa a 7ª posição no *ranking* de produção leiteira no Brasil com a aquisição nacional referente a 8,4%, sendo considerado um dos estados brasileiros que contribuiu com um intenso aumento na produção (+14,69 milhões de litros de leite) no 1º trimestre de 2017 (IBGE, 2017).

No estado do Rio de Janeiro a produção de leite ocupa lugar de destaque na economia de agronegócio, estando presente na quase totalidade de seus municípios, gerando um grande número de empregos permanentes nos diversos setores da cadeia. Além disso, um grande

percentual (82%) de agricultores familiares é responsável pela produção leiteira do Estado, e, em sua grande maioria, produzem menos de 100 litros dia (EMATER-RIO, 2016).

Frente a esses dados, é notório que a produção de leite vem consolidando-se como atividade âncora na composição da renda dos pequenos agricultores, impactando o desenvolvimento regional, destacando-se por fatores ligados a aquisição de mão de obra, alcance social e implementação de valor na propriedade, possibilitando o uso de terras de qualidade inferior para o desenvolvimento dessa atividade (BERRO et al., 2014). Conforme SCHUBERT & NIEDERLE (2009) a cadeia produtiva leiteira de base familiar mostra-se promissora, levando em conta as previsões de que o Brasil apresente crescimento nesse seguimento e também a capacidade de rápida adaptação e reconversão produtiva desse sistema.

2.2.Mastite bovina associada à *Escherichia coli*

O processo inflamatório da glândula mamária conhecido como mastite é o problema de saúde mais prevalente em vacas leiteiras e uma das principais razões para a remoção permanente desses animais dos rebanhos (USDA, 2007b). As perdas econômicas devido à mastite incluem reduções na produção de leite, aumento do custo de produção, redução da qualidade do leite, redução da longevidade, aumento do trabalho, custos elevados com tratamento, além de ocasionar a transmissão para outros animais (SEEGERS et al., 2003; GRÖHN et al., 2004; PINZÓN-SÁNCHEZ & RUEGG, 2011). Uma variedade de agentes patogênicos pode causar mastite em vacas leiteiras; historicamente, os patógenos de mastite contagiosa mais comuns foram *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* (NMC, 1999). No entanto, a adoção de práticas modernas de ordenha resultou em um declínio considerável na prevalência desses organismos em muitos rebanhos leiteiros de países desenvolvidos como os Estados Unidos (MAKOVEC & RUEGG, 2003).

Nos Estados Unidos, vários estudos mostraram que os patógenos prevalentes que causam mastite clínica em vacas são geralmente microrganismos originários do meio ambiente, sendo os mais comuns Estafilococos Coagulase Negativo (ECN), *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* (NMC, 1999; LAGO et al., 2011; PINZÓN-SÁNCHEZ & RUEGG, 2011; SCHUKKEN et al., 2011).

Escherichia coli atua como patógeno prevalente isolado da mastite em vacas leiteiras, sendo considerada um agente crucial durante o desenvolvimento da doença. Os patógenos de mastite ambiental são frequentemente associados à mastite clínica e quando ocasionada pela *E. coli* é frequentemente caracterizada por infecções intramamárias de curta duração e geralmente

é eliminada espontaneamente (BURVENICH et al., 2003). No entanto, a infecção intramamária causada por esse microrganismo pode ser grave, com sinais clínicos e dano tecidual significativo à glândula mamária (WENZ et al., 2001).

As células somáticas (leucócitos, predominantemente neutrófilos e células epiteliais) são consideradas um indicativo da qualidade do leite de acordo com saúde da glândula mamária, no qual se elevam com o intuito de neutralizar as toxinas liberadas pelos microrganismos e regenerar o tecido do epitélio secretor. Estudos mostram que a contagem dessas células em proporção menor que 100.000 cél/mL no leite, mantém os quartos mamários livres de patógenos (MORE, 2009; FAGUNDES et al., 2011; AWALE et al., 2012; GOLI et al., 2012; DALTON; ISRAELSEN; YOUNG, 2017).

2.3. Caracterização da *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, caracterizada morfológicamente como microrganismo bacilar, gram negativo, fermentador de lactose, sacarose e glicose (com produção de gás), oxidase negativa, catalase positiva, podendo ou não apresentar motilidade devido a presença de flagelos peritríquios, sendo incapaz de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono devido à ausência da enzima citrato permease (WELCH et al., 2006). Possui a capacidade de crescer a partir de uma variedade de fonte de carbono e em temperaturas que variam de 5°C a 45°C, tendo como a temperatura ideal de crescimento de 37°C. São microrganismo resistentes ao calor, sobrevivendo a 60°C por 15 minutos ou 55°C por uma hora, tolerando uma variação de pH na faixa 4,4 a 7,0 (ALTWEGG & BOCKMUHL, 1998).

Cepas dessa espécie são consideradas comensais por colonizarem o trato gastrointestinal, podendo estar envolvido em vias metabólicas do mesmo, tendo papel na síntese de vitaminas, além de atuar como principal membro anaeróbio facultativo da microbiota intestinal de humanos e animais (NATARO & KAPER, 1998; KAPER, 2004).

A via de transmissão de *E. coli* é fecal-oral por meio de água e alimentos contaminados. Comumente isoladas de fezes, dificilmente causa doença em seus hospedeiros, porém em animais debilitados, imunocomprometidos ou com a barreira gastrointestinal alterada, cepas de *E. coli* não patogênicas presentes no intestino podem causar infecção (DRASAR & HILL, 1974; NATARO & KAPER, 1998).

2.3.1 Caracterização antigênica

A tipificação sorológica é fundamental para caracterização da *E. coli* associada às infecções e para estudos epidemiológicos. A sorotipagem está baseada na composição antigênica encontrada em certas estruturas superficiais das células bacterianas classificando este agente em sorogrupo e sorotipos (NATARO & KAPER; 1998; FRANCO, 2002).

Os antígenos somáticos (O) para sorogrupos são termoestáveis e estão relacionados com polissacarídeos da membrana externa, os antígenos flagelares (H) são termolábeis relacionados com proteínas dos flagelos, enquanto que os antígenos capsulares (K) termoestáveis são relacionados com polissacarídeos capsulares. Os antígenos fimbriais (F) formam um quarto sistema de sorotipagem, especificamente para as cepas que apresentam essas estruturas e são importantes na patogênese (NATARO & KAPER, 1998; FRANCO, 2002).

Mais de quatrocentos diferentes sorotipos O:H de EHEC têm sido isolados de bovinos, o que torna seu estudo necessário e importante devido ao envolvimento direto na causa de doenças gastrintestinais humanas (BETTELHEIM et al., 2005).

2.3.2 Classificação filogenética de *Escherichia coli*

Diversos grupos bacterianos têm se separado dentro de uma mesma espécie de microrganismo devido a fenômenos de proximidade evolutiva. Filogrupos de *E. coli*, como são chamados, vêm sendo reconhecidos ao longo dos anos (SELANDER et al., 1987; HERZER et al., 1990; WIRTH et al., 2006). Em meados dos anos 80 e 90, SELANDER et al. (1987) e HERZER et al. (1990), utilizaram técnicas de multilocus enzimático e ribotipificação, para desenvolver a primeira caracterização filogenética de *E. coli*; no qual mostrou que cepas deste agente podem ser classificadas dentro de quatro grupos principais: A, B1, B2 e D, contudo, estas são laboriosas, demoradas e de alto custo. Além disso, a caracterização dos filogrupos é muitas vezes prejudicada por limitações encontradas nessas técnicas. Uma estratégia que vem sendo utilizada para minimização desses vieses e para determinação do grupo filogenético de *E. coli* é a análise da distribuição dos marcadores de virulência para classificação de cepas nos grupos filogenéticos através de uma PCR multiplex (Figura 1) (JOHNSON et al., 2001; CLERMONT et al., 2000). Neste caso três marcadores moleculares são utilizados por CLERMONT et al. em 2000, para tais determinações: *chuA*, um gene necessário para o transporte do grupo heme em *E. coli* enterohemorrágica (0157: H7) (BONACORSI et al., 2000). O *yjaA*, um gene inicialmente identificado através do sequenciamento do genoma de *E.*

coli K12, cuja função ainda é desconhecida (BLATTNER et al., 1997) e um fragmento de DNA anônimo designado TSPE4.C2 (BONACORSI et al., 2000).

Assim, *E. coli* extra-intestinal (ExPEC) com potencial de virulência classifica-se no grupo B2 e, em menor grau, ao grupo D, enquanto que a maioria das cepas comensais, que muitas vezes não possuem determinantes de virulência, estão afiliadas aos grupos A e B1 (BRANGER et al., 2005; SABATÉ et al., 2006). Além disso, as características fenotípicas como a utilização de diferentes açúcares, perfil de resistência e temperatura ideal de crescimento, auxiliam para a diferenciação em si dessas cepas dentro dos quatro grupos propostos (GORDON et al., 2005).

Desta forma, esse método tem sido considerado útil na classificação de cepas desconhecidas de *E. coli*, identificando-as como potenciais patogênicas ou comensais e orientando na investigação de genes de virulência específicos (GORDON et al., 2008; KIEFFER et al., 2017).

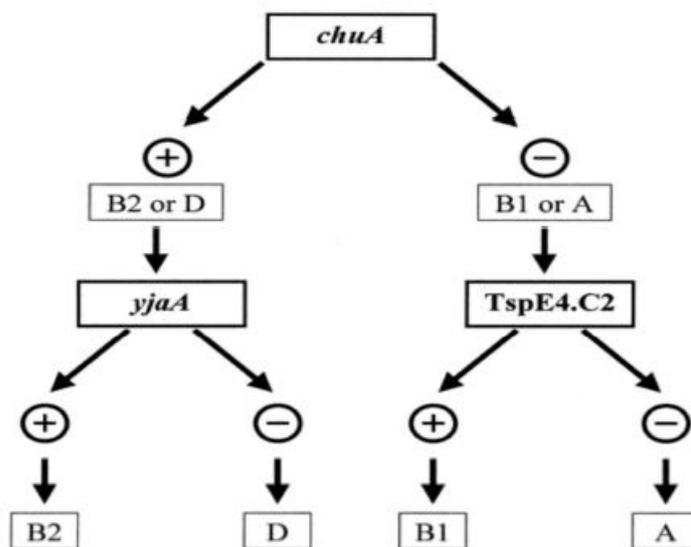


Figura 1. Determinação de cepas de *E. coli* em grupos filogenéticos através da PCR multiplex. Fonte: CLERMONT et al., 2000.

2.3.3 Classificação em patótipos

Como na maioria dos patógenos de mucosa, *Escherichia coli*, segue uma estratégia de infecção: i) colonização da mucosa, ii) evasão das defesas do hospedeiro, iii) multiplicação e iv) dano ao hospedeiro. *E. coli* causadoras de infecções, em geral, apresentam diferentes sorotipos e fatores de virulência. Esses fatores de virulência são codificados por genes presentes em ilhas de patogenicidade ou em plasmídeos de virulência, podendo também ser transferidos

entre cepas de *E. coli* por bacteriófagos. 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, algumas cepas de *E. coli* que possuem determinados grupos (O) apresentariam vantagens no carreamento de material genético relacionado a determinados fatores e virulência, incluindo a produção de toxinas (EVANS et al., 1997).

Atualmente, a detecção de genes de virulência por PCR tem demonstrado ser rápida, prática e sensível na identificação de *E. coli* relacionada com a patogenicidade (NATARO & KAPER, 1998; GYLES & FAIRBROTHER, 2010). As cepas consideradas patogênicas podem ser classificadas em grupos ou patótipos de acordo com a produção de fatores de virulência e mecanismos pelos quais causam doença (NATARO & KAPER, 1998; KAPER et al., 2004). Os principais patótipos dessa espécie são *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigenica (ETEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAggEC ou EAEC) (BEAN et al., 2004).

A EPEC promove uma lesão denominada de *attaching and effacing* - A/E. Esta lesão A/E é caracterizada por uma adesão íntima da bactéria através da adesina intimina ao epitélio intestinal, com destruição das microvilosidades intestinais, alterações no citoesqueleto, com formação de estruturas semelhantes a pedestais e acúmulo de actina polimerizada logo abaixo da ligação da bactéria à célula. A adesina intimina, uma proteína de 94 kDa da membrana externa da bactéria, é codificada pelo gene *eae* localizado na LEE e é a molécula de adesão responsável pela ligação íntima da bactéria ao enterócito. (MAINIL & DAUBE, 2005; MAINIL, 2013).

As EPEC podem ser classificadas em típicas e atípicas, no qual ambas possuem o gene *eae* (“EPEC *attaching and effacing*“), porém a EPEC típica possui o plasmídio EAF (“EPEC *adherence factor*”), já a atípica é desprovida do plasmídio EAF, podendo apresentar fatores de virulência adicionais (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Esse patótipo é responsável por colonizar principalmente o intestino delgado e sua aderência nas microvilosidades intestinais desencadeia a expressão dos genes localizados na LEE (*locus enterocyte effacement*) (MAINIL & DAUBE, 2005; MAINIL, 2013).

Conhecida como *E. coli* verotoxigênica (VTEC), em função do efeito citotóxico em células Vero, *E. coli* EHEC ou *E. coli* STEC compreende um grupo importante de patógenos

entéricos zoonóticos podendo em alguns casos determinar doença fatal. Este grupo se refere a cepas de *E. coli* produtoras de pelo menos umas das toxinas Shiga (Stx1 ou Stx2). Stx1 é muito semelhante a principal citotoxina produzida pela *Shigella dysenteriae* sorotipo 1. Entre os membros do Stx2, há algumas diferenças, apresentando 56% de homologia com a Stx1, neste grupo estão inseridos os sorotipos O157, O26 e O111 (GYLES et al., 2004; GYLES & FAIRBROTHER 2010). Os genes que codificam Stx estão presentes e são transferidos por bacteriófagos para as cepas de *E. coli*. (CROXEN & FINLAY, 2010; MAINIL, 2013). Ruminantes não possuem esses receptores para Stx no endotélio vascular, mas os mesmos estão presentes nos enterócitos das criptas, linfócitos intraepiteliais e macrófagos da mucosa intestinal. Bezerros infectados com estes patótipos não apresenta sinais clínicos, entretanto estes animais constituem importante reservatório de STEC/ EHEC tanto para bovinos como para o homem (GYLES & FAIRBROTHER, 2010). O sorotipo de EHEC mais conhecido e de maior importância para seres humanos é o O157:H7, responsável por surtos de diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica e síndrome hemolítico urêmica (BUCHANAN & DOYLE, 1997).

Em relação aos mecanismos de patogenicidade relacionados a EIEC, estudos mostram que em humanos e animais, estas cepas são capazes de causar distúrbios no intestino grosso, provocando febre e diarreias profusas contendo muco e sangue. (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009). As linhagens EIEC invadem ativamente as células do cólon, auxiliadas por plasmídeos, o qual carrega todos os genes necessários para a virulência e assim propagam-se lateralmente para as células adjacentes, virtualmente idênticas às espécies de *Shigella*. No entanto, as EIEC não produzem toxinas Shiga (MINAGAWA, 2007).

Já as ETEC são caracterizadas por colonizarem a superfície da mucosa do intestino delgado, principalmente o íleo, e por produzirem enterotoxinas termoestáveis (ST) e termolábeis (LT) que alteram as funções dos enterócitos, aumentando a secreção e reduzindo a absorção de líquidos, sem induzirem alterações morfológicas significativas no intestino (NAGY & FEKETE, 2005). Sendo a adesão de ETEC no intestino delgado acometida por fatores de colonização, fimbriais ou não fimbriais (CROXEN & FINLAY, 2010).

E por fim as cepas da EAEC (ou EaggEC) que se caracterizaram pela aderência agregada (AA) às células epiteliais cultivadas, o que produz um padrão de "tijolo empilhado". A maioria das cepas de EAEC colonizam a mucosa intestinal utilizando fímbrias de aderência agregada (AAF). Esta bactéria estimula a secreção mucóide e se liga a ela, formando um biofilme, causando assim uma colonização persistente e diarreia (MINAGAWA, 2007). Além disso, produzem uma toxina termolábil relacionada antigenicamente a hemolisina, mas que não é

hemolítica, e uma toxina (citotoxina) termoestável enteroagregativa codificada por um plasmídeo (EAST1). Produzem uma toxina do tipo ST e uma do tipo hemolisina. Algumas cepas são conhecidas por produzirem uma toxina do tipo shigatoxina (verotoxina) (CAMPOS & TRABULSI, 2002; SYDOW, 2005).

2.4. Dispersão de *Escherichia coli* no ambiente de produção leiteira

A saúde da glândula mamária, a higiene de ordenha, o ambiente em que os animais ficam alojados e os procedimentos de limpeza do equipamento de ordenha são fatores que podem levar a contaminação microbiana do leite cru (SANTOS & FONSECA, 2001).

Dos microrganismos presentes no rebanho leiteiro destaca-se a *Escherichia coli* que são indicadoras de contaminação de origem fecal. O gado leiteiro tem se apresentado como o reservatório mais importante de vários sorotipos de *E. coli* (HUSSEIN & SAKUMA, 2005; OLIVEIRA et al., 2012). A contaminação do gado pode se dar de forma indireta, a partir de água ou outras fontes ambientais contaminadas, ou de forma direta animal-animal, sendo a introdução de novos animais no rebanho também um ponto crítico (FARROKH, 2013).

Estudos já detectaram cepa de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) contaminando vários pontos dentro das fazendas como o chão e divisores das baias, na alimentação dos animais, água e manipuladores, que pode servir como fontes de transmissão desse patógeno aos animais (COBBOLD & DESMARCHELIER, 2002). Segundo GAUTAM et al. (2011) a água de beber contaminada pode ser a principal fonte de transmissão de STEC O157:H7 em bovinos, principalmente em meses mais quentes. Temperaturas ambientes mais altas podem favorecer a replicação mais rápida da bactéria, fator que somado a taxas de reposição mais lentas da água aumentariam a carga de STEC (GAUTAM et al., 2011). Estudos realizados em regiões tropicais e temperadas sugerem que a *E. coli*, em condições favoráveis, é capaz de replicar-se e atingir alta densidade populacional, mesmo fora de um hospedeiro (DESMARAIS et al., 2002; ISHII et al., 2006).

Além disso, a água utilizada na ordenha para limpeza, tanto dos tetos dos animais como dos equipamentos, pode ser uma via de transmissão de microrganismos para a glândula mamária, comprometendo a saúde do rebanho e a qualidade do leite produzido. A água com altas concentrações microbianas também possibilita a contaminação direta do leite (PEREIRA et al., 2016).

A hipótese mais provável é a de que, uma vez liberada na água, a população de *E. coli* originada da microbiota humana e de animais (hábitat primário) sofra uma pressão seletiva do

meio ambiente, como privação de nutrientes, a baixa temperatura, salinidade, a exposição à radiação solar e a competição com comunidades microbianas locais, havendo uma perda de parte da população no hábitat secundário e resultando na persistência de algumas cepas de *E. coli* que possuam vantagens adaptativas (WALK et al., 2007; RATAJCZAK et al., 2010; LUO et al., 2011; PACHEPSKY & SHELTON, 2011). Esta capacidade de persistir em habitats secundários pode implicar uma atenuação da adequação da *E. coli* como microrganismo de escolha para análise de contaminação fecal em águas e alimentos (SOLO-GABRIELE et al., 2000). Além disso, a contaminação também pode ocorrer nas operações de colheita, preparação para o mercado e distribuição, sendo a higiene dos funcionários fundamental para garantir a segurança, pois pode haver contaminação a partir do manipulador portador de *E. coli* (ALMEIDA, 2005).

2.5. Formação de biofilme por *Escherichia coli*

Biofilmes são compreendidos como comunidades complexas de microrganismos, podendo ser a mesma ou várias espécies, compostas por densos agregados de células microbianas envoltas em uma matriz de exopolissacarídeos (EPS), que é produzida pelos próprios microrganismos e que se encontram aderidos a superfície sólida, de natureza inorgânica ou orgânica, abrangendo um amplo espectro de ambientes (DONLAN & COSTERTON, 2002).

O biofilme permite que as bactérias também sejam capazes de aderir às superfícies e ancorar em ambientes aquosos, de modo que as células adquiram vantagens específicas ao invadir os tecidos, tais como a resistência causada por antimicrobianos e forças de cisalhamento. Ademais, constitui um modo de proteção em ambientes de estresse e possui um importante papel na virulência do microrganismo (VAN HOUDT & MICHIELS, 2005).

O processo de formação de um biofilme bacteriano inicia-se com a adesão da bactéria ao substrato com conseqüente produção de exopolissacarídeos, maturação e dispersão de células planctônicas para novas áreas. Na etapa inicial, a bactéria interage e adere-se ao substrato ou interface através de flagelos e adesinas, uma vez aderidas e agregadas o suficiente, inicia-se a produção de exopolissacarídeos (EPS) envolvendo então a comunidade bacteriana no desenvolvimento do biofilme. Em seguida ocorre a maturação do biofilme, onde ele toma forma e segue-se o processo de dispersão, onde bactérias se despreendem e tem a chance de formar novos biofilmes em outros locais (KAU et al., 2005).

Cada etapa na formação do biofilme requer a reprogramação da expressão gênica, e esta reprogramação ocorre em resposta às mudanças ambientais (PRUSS et al., 2006).

A avaliação e caracterização da formação do biofilme vem sendo fortemente estudada e representa um desafio para os pesquisadores (DYER et al., 2007; FUQUAY, 2011). Isto é principalmente devido ao fato de que os biofilmes são compostos de estruturas complexas e heterogêneas com uma ampla versatilidade em morfologia, propriedades mecânicas e composição química (PICIOREANU et al., 2000). Até o momento sabe-se que a produção de biofilmes também está relacionada a inúmeros genes que, em resposta a estímulos ambientais/externos, codificam diversas estruturas, como proteínas e substâncias poliméricas extracelulares (EPS), envolvidas no desenvolvimento e estabelecimento dessa complexa comunidade de microrganismos (DOMKA et al., 2007; FLEMMING et al., 2007; LANDINI, 2009).

Os microrganismos envolvidos na produção do biofilme promovem um mecanismo de sinalização entre as células, no qual desempenham um papel na organização da comunidade microbiana. Neste mecanismo, as células atuam na regulação da expressão gênica, devido à densidade de populacional bacteriana, chamada de *quorum sensing*, no qual produzem moléculas de sinalização extracelulares chamadas autoindutores, que coordenam a expressão gênica na população (SCHAUDER et al., 2001).

A formação de biofilmes de estirpes comensais e patovares de *E. coli* é inexplorada, considerando o grande número de fímbrias funcionalmente não caracterizadas, operons de exopolissacarídeos potenciais e já confirmados bem como grande número de informações genômicas transferidas horizontalmente, incluindo aderência e fatores de biofilme comprovadas (ONG et al., 2009; KOREA et al., 2011).

Estudos em cepas de *E. coli* foram realizados afim de pesquisar estes mecanismos de biofilme e assim foi possível observar diferentes estruturas que desempenham papéis importantes na superfície bacteriana durante o processo da formação do biofilme (PRUSS et al., 2006). As fímbrias tipo 1 e os flagelos são responsáveis respectivamente pela adesão inicial e a motilidade, importantes para o estabelecimento do biofilme (SCHEMBRI et al., 2003). Além destas estruturas também foi descrita a capacidade de agregação no biofilme bacteriano proporcionada pelo antígeno 43 (Ag43), uma proteína de membrana externa encontrada em *E. coli* K12 e fímbria *curli* (CsgA), uma proteína de membrana, relacionada, dentre outras, a adesão e persistência da bactéria ao substrato (DANESE et al., 2000).

As fimbrias tipo 1 são fatores de virulência exigidos em infecções do trato urinário e formação de biofilmes intracelulares, sugerindo várias implicações fisiológicas significativas (ANDERSON et al., 2003). A proteína FimH está localizada na ponta da estrutura fimbrial e serve como adesina específica que se liga à D-manose, e assim ajuda a imobilizar a bactéria em superfícies bióticas e abióticas. (BHOMKAR et al., 2010). A manose é uma subunidade da fimbria tipo 1 chamada Fimh, com características heterogêneas e diferentes isoformas, onde ligam-se seletivamente a resíduos de manomanose ou trimanoses das células do hospedeiro (muco e superfícies abióticas), além de ser o componente responsável pela ligação da bactéria a uma variedade de receptores formados por glicoproteínas (MOURA, 2010).

Este filamento proteico denominado Fimbria Tipo 1 é codificada pelo gene *fimH* e possuem os níveis de expressão mais elevados em cepas patogênicas, mesmo que as estirpes de *E. coli* comensais também expressem fimbrias (ADICPTANINGRUM et al., 2009).

A descoberta das primeiras fimbrias curli ocorreu no final da década de 1980 em cepas de *Escherichia coli* que causaram mastite bovina (BARNHART & CHAPMAN, 2007; BELOIN et al., 2008). As fimbrias curli (fibras amilóides) são conhecidas como principal elemento proteico da matriz extracelular (biofilme) produzida por *Salmonella* spp. e *E. coli*. Estas são designadas a partir de uma única proteína curlin, da qual esses filamentos são formados em um processo de nucleação dependente em que a proteína da subunidade principal, CsgA é secretada (KLINE et al., 2009). A fimbria curli em *E. coli* é codificada pelo gene da subunidade o *csgA*, que desempenha um papel importante na adesão inicial nas superfícies biótica e abiótica e medeiam as interações célula-célula, interagindo especificamente com proteínas da matriz tais como fibronectina, laminina e plasminogênio para iniciar a adesão e colonização, além de ser indutores potentes da resposta inflamatória do hospedeiro (BELOIN et al., 2008; MCCRATE et al., 2013).

Outra estrutura que possivelmente estaria implicada na adesão e/ou formação de biofilme é o antígeno 43 (Ag43), uma proteína de membrana externa autotransportadora (AT) de superfície amplamente distribuída em *E. coli* patogênicas e comensais, no qual a sua expressão é codificada pelo gene *flu* que confere capacidade de agregação célula-célula, resultando em floculação e sedimentação bacteriana (BELOIN et al., 2008; HERNANDES et al., 2011; EJRNAES, 2011). As proteínas autotransportadoras possuem um domínio C-terminal que forma o poro através do qual a proteína madura (ou domínio passageiro) irá atravessar a membrana externa da bactéria, por isso a nomenclatura “autotransportadora” (HENDERSON et al., 2000; HENDERSON & NATARO, 2001). Além disso, o ag43 é capaz de promover a

formação de biofilme bacteriano, bem como a sobrevivência e persistência da bactéria durante uma infecção prolongada (KJAERGAARD et al., 2000a).

No que tange a importância da formação deste fator de virulência por *E.coli* causadoras de mastite, destaca-se a associação do biofilme à persistência da bactéria na glândula mamária e também no ambiente de ordenha. O uso da tecnologia na prática da ordenha deveria estar diretamente relacionado à maior produtividade e menor grau de contaminação. No entanto, sem as práticas de higiene esta mecanização torna-se uma ferramenta de disseminação de microrganismos tanto para a glândula mamária quanto para o leite, acarretando danos tanto para a saúde do animal quanto para a qualidade do leite. Apesar da etapa de limpeza ser capaz de reduzir a carga microbiana, observa-se que a maioria ainda permanece aderida, principalmente quando há a formação de biofilmes bacterianos. Alguns sanitizantes não agem em resíduos da matéria orgânica que permanecem no equipamento após o processo de limpeza incorreto, não sendo capazes de destruir totalmente as células sésseis viáveis (SIMÕES et al., 2006).

2.6. MALDI TOF MS como uma ferramenta para confirmação da espécie

Estudo geral das proteínas e enzimas ou o estudo integrado da soma de todas as proteínas produzidas pelos organismos ou grupo de organismos é o que define a metodologia proteômica, idealizada com o intuito de produzir informações qualitativas sobre proteínas relacionadas com a identificação, distribuição, interações, estrutura e função, e informações quantitativas como a abundância, distribuição dentro de diferentes localizações, variações temporais de abundância devido a síntese e degradação ou ambos (JAMESDANIEL et al., 2009; OTTO et al., 2012).

A espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) tornou-se mais conhecida no final da década de 90 e tem sido utilizada como uma análise proteômica para identificar e diferenciar diversos agentes patogênicos bacterianos em nível de gênero e espécie por ser um método rápido, preciso e eficaz em termos de caracterização microbiana (DIECKMANN et al., 2008; ILINA et al., 2009; NAGY et al., 2009; CROXATTO et al., 2012). Esta técnica está baseada numa porção da amostra sobreposta por uma matriz capaz de fornecer prótons (ou H^+) para o processo de ionização dos componentes da amostra. A energia emitida por um laser é absorvida pela matriz, ocorrendo assim a transferência de prótons da matriz para os componentes da amostra e ao mesmo tempo desencadeando um processo de dessorção (substância é liberada através de uma superfície), no qual a amostra passa do estado sólido para o gasoso. Desta forma, as amostras ionizadas e

dessorvida são direcionadas para o analisador TOF, onde são aceleradas através de um campo elétrico dentro de um tubo a vácuo onde os componentes da amostra são separados de acordo com suas m/z , chegando a um detector em diferentes tempos (TANAKA et al., 1988). MALDI-TOF MS tem sido bastante aplicada em estudos de identificação de diferentes gêneros de bacilos Gram-negativos, tais como *Escherichia coli* e outros membros da família Enterobacteriaceae a partir de amostras clínicas de humanos, porém autores têm investigado a capacidade do MALDI-TOF em discriminar e caracterizar isolados ambientais de *E. coli* obtidas a partir de amostras de fezes provenientes de mamíferos e aves (SIEGRIST et al., 2007; RICHTER et al., 2013).

2.7. Técnicas de tipagem molecular

As doenças infecciosas têm sido um embate na morbidade em todo o mundo, causando dezenas de milhões de mortes por ano, principalmente, em caso que não dispõem de mecanismos eficazes de prevenção e controle. O laboratório tem se tornado importante no diagnóstico do agente infeccioso e no apoio a vigilância epidemiológica atuando no diagnóstico e na tipagem de microrganismos que compreende na diferenciação de diversos tipos de organismos dentro de uma mesma espécie (REGUA-MANGIA, 2015).

Os métodos clássicos de tipagem baseavam-se em metodologias fenotípicas tais como sorotipagem, fagotipagem, biotipagem, padrão de resistência a antimicrobianos (antibiotipagem) entre outros. No entanto, esses métodos convencionais são muitas vezes limitados devido a sua baixa capacidade em discriminar linhagens pertencentes a uma mesma espécie e a problemas referentes à reprodutibilidade intra e inter laboratoriais (FOXMAN et al., 2005).

Assim, na tentativa de suprir os problemas com reprodutibilidade e baixo poder de discriminação, métodos moleculares capazes de avaliar a relação genética entre os isolados têm sido desenvolvidos e utilizados com grande sucesso na caracterização, identificação e em estudos epidemiológicos, permitindo diferenciar entre os tipos e subtipos de espécies bacterianas (SABAT et al., 2013).

A compreensão do parentesco clonal entre as cepas é essencial para determinar a fonte e as rotas de infecção, identificar um surto, determinar os veículos de transmissão, reconhecer cepas particularmente virulentas e avaliar a eficácia das medidas de controle (PÉREZ-LOSADA et al., 2013; VAN BELKUM et al., 2001).

A escolha do método molecular de tipagem apropriado depende significativamente do problema a se resolver e do contexto epidemiológico no qual o método vai ser utilizado, assim como a escala geográfica e a escala de tempo da investigação (SABAT et al., 2013).

De acordo com SILVEIRA et al. (2002), o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) está entre as melhores técnicas de caracterização molecular, por apresentar grande capacidade de diferenciação entre as amostras bacterianas analisadas. Porém, é uma técnica laboriosa, no qual exige DNA em grande quantidade, além de equipamentos caros, manutenção e mão-de-obra especializada.

Esta técnica tem sido utilizada no Japão desde 1996, quando foram registrados muitos surtos alimentares causados por *E. coli* O157:H7 e foi adotada como método de rotina para identificação desta bactéria nos laboratórios de pesquisa japoneses (WATANABE et al., 1996; PEI et al., 2007). Ainda neste país, aproximadamente 2000 cepas de *E. coli* O157:H7 são identificadas anualmente pela técnica de PFGE, porém em um estudo conduzido por TERAJIMA et al. (2002) foi observado, em casos esporádicos, cepas indistinguíveis de *E. coli* O157:H7, o que levou ao entendimento de muitos pesquisadores para a utilização de outros métodos de tipagem molecular (PEI et al., 2007).

Novas técnicas de *fingerprinting* de DNA como *Multilocus Sequence Typing* (MLST), estão emergindo como alternativas, particularmente quando informações sobre história evolutiva são necessárias (SOLL et al., 2003). MLST é uma técnica relativamente nova em que genes múltiplos (loci) são sequenciados para medir a relação genética e analisar a variação da sequência entre os alelos de muitas cepas (MAIDEN et al., 1998).

MLST já foi usado para caracterizar uma série de bactérias patogênicas, incluindo *Neisseria meningitidis*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Campylobacter* spp. (ENRIGHT, 2000; DINGLE et al., 2001; NALLAPAREDDY et al., 2002). Em estudos que comparam MLST com PFGE entre os isolados de *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Enterococcus faecalis* e *S. aureus*, verificou-se que MLST possui capacidade discriminatória similar ou maior do que a PFGE (KOTETISHVILI et al., 2002; NALLAPAREDDY et al., 2002; PEACOCK et al., 2002; KOTETISHVILI et al., 2003). No entanto, esses resultados podem não ser generalizáveis para todas as espécies, uma vez que um estudo comparando MLST com PFGE em *E. coli* O157:H7 descobriu que a PFGE tinha maior habilidade discriminatória do que MLST (NOLLER et al., 2003).

2.7.1. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

A técnica de PFGE foi descrita pela primeira vez em 1984 por SCHWARTZ & CANTOR (1984) como uma ferramenta para estudar o DNA cromossômico de organismos eucariotos, onde está baseada na análise dos perfis gerados pela atuação da enzima de restrição no DNA bacteriano, permitindo a comparação clonal entre as cepas (TENOVER et al., 1997). Embora laboriosa, esta tem sido considerada “padrão ouro” para diferenciação clonal de vários patógenos bacterianos, sendo usada rotineiramente para subtipo de várias espécies bacterianas, incluindo *Escherichia coli* e tendo como princípio a melhor separação de fragmentos de DNA de alto peso molecular em gel de agarose, além de possuir maior poder discriminatório em relação as demais, ela também tem sido uma técnica muito eficiente para identificar cepas clonais de *E. coli* que causam surtos de diarreia (LEOMIL et al., 2005; JI et al., 2006; ADKINS et al., 2016; PERSING, 2004; GOERING, 2004).

A extração de DNA cromossômico a ser usado em PFGE é feita com a inserção das células bacterianas em blocos de agarose conhecido como *plug*, que proporciona proteção mecânica às moléculas de DNA. Essas células são lizadas com detergente e desproteinizadas utilizando proteinase K (TENOVER et al., 1997). Assim, a digestão do DNA bacteriano livre, ocorre através de uma enzima de restrição, que deve ser uma endonuclease de corte raro e que possui poucos sítios de reconhecimento, gerando um perfil com aproximadamente 10 a 30 fragmentos de restrição que variam de 10 a 1000 kb em tamanho. A enzima de restrição utilizada para *E. coli* é a *XbaI* que reconhece e cliva na sequência T-CTAGA das moléculas DNA. Com isso, todos esses fragmentos podem ser separados em um padrão de bandas distintas por PFGE, pois em contraste a eletroforese convencional, no qual a corrente elétrica é aplicada no gel em uma única direção, a corrente no PFGE, é fornecida em diferentes ângulos pré-determinados por curtos períodos de tempo, ao qual chamamos de pulsos, que se alternam entre três conjuntos de eletrodos, resultando em um alto nível de resolução dos fragmentos (TENOVER et al., 1997; ANDREI et al., 2006).

Um dos modelos mais comumente utilizado no PFGE é sistema de campo elétrico homogêneo (CHEF), onde a carga negativa do DNA é corrida através de um plano de uma matrix de gel de agarose em direção ao polo positivo. Quando ocorre a troca na direção do campo elétrico, as moléculas de DNA são reposicionadas de forma paralela ao campo de força antes de migrarem para o polo positivo. Os fragmentos menores se reorientam mais facilmente que os maiores que levam mais tempo para se adaptarem à nova direção (MAGALHÃES et al., 2005).

Diferentes metodologias eram descritas para execução do PFGE impedindo a reprodutibilidade e comparação de resultados entre laboratórios. Mediante a esse fato, foi criado o *Prevention PulseNet*, por meio da colaboração de diferentes laboratórios do *U. S. Centers for Disease Control* (CDC) (GOERING, 2004; RIBOT et al., 2006). O *PulseNet* definiu alguns aspectos que devem ser seguidos para realização desta técnica. Dentre eles incluem-se: (1) o cromossomo da bactéria deve ser isolado de forma intacta; (2) a qualidade da preparação das amostras deve permitir a ação de enzimas de restrição; e (3) a concentração do DNA deve ser o suficiente para a produção de bandas (GOERING, 2004).

Além disso, critérios internacionais são utilizados para a análise e a interpretação dos resultados do PFGE considerando a ocorrência de eventos genéticos. De acordo com esses critérios, diferentes cepas com o mesmo padrão de bandas são definidas como a mesma cepa. Aquelas que são consideradas estreitamente associadas, diferem de uma a três bandas apenas. As cepas que diferem de quatro a seis bandas, sugerem a ocorrência de eventos genéticos independentes e são consideradas como possivelmente relacionadas. Já as cepas que possuem mais de seis bandas de diferença demonstram a ocorrência de três ou mais eventos genéticos e são classificadas como epidemiologicamente não relacionadas (LUKINMAA et al., 2004; SINTCHENKO, GALLEGO, 2009, REGUA-MANGIA, 2015).

Ao final, a análise do padrão de bandas gerado é realizada através de *softwares* especializados que comparam as linhagens estabelecendo, assim, a similaridade genotípica entre elas (SINGH, 2006).

2.7.2. Multilocus Sequence Typing (MLST)

O MLST é uma técnica de caracterização molecular e investigação epidemiológica proposta por MAIDEN et al. (1998), com a finalidade de superar os problemas de reprodutibilidade inter-laboratoriais enfrentados nas metodologias de tipagem tradicionais. Além disso, também tem sido amplamente utilizada para inferência filogenética de espécies bacterianas (MAIDEN et al., 1998; COOPER & FEIL, 2004; NEMOY et al., 2005; HARBOTTLE et al., 2006).

Este método foi desenvolvido em 1998 com os objetivos adicionais de fornecer uma abordagem de caracterização de isolamento bacteriano unificado que podem ser usados para estudos evolutivos e populacionais de uma ampla gama de bactérias. (MAIDEN et al., 2006). Inicialmente o MLST foi realizado com o patógeno humano *Neisseria meningitidis* como exemplo. Porém, pouco tempo depois, o método foi estendido a outras espécies de bactérias e,

ao longo do tempo, tornou-se uma ferramenta muito popular para estudos epidemiológicos mundiais, e para estudos sobre a evolução molecular de patógenos (ENRIGHT et al., 2000).

Esta técnica se baseia nos conceitos genéticos que sustentaram a técnica anterior *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), apoiando-se no estudo de diferentes alelos de genes *housekeeping*. A principal diferença entre estas duas metodologias, é que o MLEE analisa a mobilidade eletroforética de isoenzimas codificadas pelos genes *housekeeping* e o MLST fundamenta-se nos múltiplos fragmentos internos presentes na sequência de DNA de genes (normalmente sete) de manutenção, os chamados *housekeeping*, identificando pontos de mutação que caracterizam alelos distintos (HANNAGE et al., 2004).

Fragmentos internos de cada gene possuem aproximadamente 500 pb e são amplificados através da reação em cadeia de polimerase (PCR), e subsequente sequenciamento do DNA de ambas as fitas, onde é permitido observar a relação genética entre as cepas que é determinada pela análise das sequências dos múltiplos genes os quais são comparados pela substituição de nucleotídeo na sequência (JOLLEY et al., 2004; RANJBAR et al., 2014). Os alelos definem a linhagem de *E. coli*, resultando em uma combinação ou perfil alélico denominado de tipo de sequência (ST) onde as cepas são agrupadas no mesmo complexo clonal (CC) caso possuam de cinco a sete genes de manutenção com sequências idênticas (DEURENBERG et al., 2008; SABAT et al., 2013). Para uma abordagem padronizada dos resultados, dados MLST estão disponíveis gratuitamente na internet (<http://www.pubmlst.net/>) para assegurar que uma nomenclatura uniforme esteja prontamente disponível a todos os que desejam trabalhar com esta técnica (MAIDEN, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo visou avaliar as relações clonais de *Escherichia coli* em ambiente de produção leiteira através das técnicas de tipagem *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

3.2 Objetivos Específicos

- Diagnosticar casos de mastite clínica e subclínica em uma propriedade leiteira situada na cidade de Barra do Piraí, durante o período de um ano;
- Isolar e identificar *Escherichia coli* no ambiente de produção leiteira em diferentes amostras como leite e fezes bovina bem como na água utilizada no manejo destes animais e cadeia produtiva através de testes bioquímicos e MALDI-TOF MS;
- Avaliar fenotipicamente a produção de biofilme das cepas de *E. coli*;
- Detectar genes de virulência relacionados à produção de toxinas e biofilme e posteriormente gerar perfis de virulência para as análises de tipagem molecular;
- Avaliar a diversidade de *E. coli* presente no ambiente estudado determinando as cepas clones, através das técnicas de MLST e PFGE;
- Avaliar a permanência de clones de *E. coli* em diferentes estações climáticas no período de um ano.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Declaração de ética

Este trabalho foi conduzido de acordo com as normas éticas e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da instituição com número de protocolo: CEUA3664040915.

4.2. Local de coleta

As amostras foram originadas de uma propriedade leiteira, no município de Barra do Piraí, situada na Região Centro Sul Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. Este município possui uma área territorial de 578,965 km², localizada a uma latitude de 22° 28' 14" Sul e longitude 43° 49' 36" Oeste, estando a uma altitude de 361 metros. A população municipal é constituída de 94.778 habitantes (Figura 2) (IBGE, 2016).

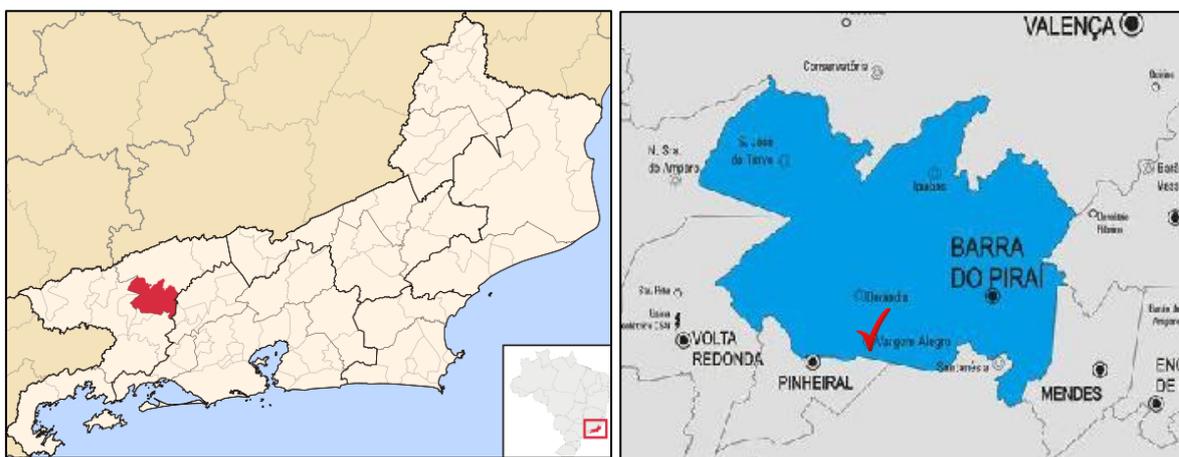


Figura 2: Mapa do estado do Rio de Janeiro. Em destaque a cidade de Barra do Piraí onde foram realizadas as coletas em estudo. Fonte: Google.

4.3. Amostragem

Foram estudadas 31 vacas em lactação na estação de Inverno (Julho, 2014 – 25°C), 37 vacas em lactação na estação da Primavera (Outubro, 2014 – 30°C), 9 vacas em lactação na estação do Verão (Março, 2015 – 29°C) e 17 vacas em lactação na estação do Outono (Maio, 2015 – 28°C), totalizando 94 animais, cujo o leite foi coletado sob forma de “pool” dos quatro quartos durante 3 semanas consecutivas. Desse modo, foi obtido um total de 282 amostras de leite. Dados sobre a temperatura foram retirados do site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) com base em dados históricos.

4.4. Diagnóstico da mastite bovina

Antes da ordenha matinal, após o procedimento de descarte dos primeiros jatos de leite e da higienização dos tetos com a solução *pré-dipping* e posterior secagem dos mesmos com papel toalha. Todas as vacas em lactação do rebanho foram submetidas ao exame clínico da glândula mamária e ao teste da caneca de fundo preto, que visualizam as alterações macroscópicas do leite, para detecção de quartos infectados com mastite clínica e o *Califórnia Mastitis Test* (CMT) para detecção da mastite subclínica (Figura 3). Para análise do CMT, realizou-se a coleta de leite de todos os quartos mamários, de cada animal, em uma bandeja e foi adicionado reagente aniônico neutro, o qual atua rompendo a membrana dos leucócitos, liberando o material nucléico (DNA), que apresenta alta viscosidade. Após as reações, os resultados foram interpretados de acordo com o grau de gelatinização: negativa (0), reação leve (+), moderada (++) , intensa (+++) (LANGONI, 2015).

Para a contagem de células somática (CCS), as amostras de leite cru, foram acondicionadas em recipientes plásticos com tampas rosqueáveis, homogeneizadas com o conservante celular Bronopol® e dispostas em caixas apropriadas em temperatura ambiente, visando à contagem eletrônica de células somáticas por citometria de fluxo, de acordo com as recomendações técnicas do equipamento. As análises foram encaminhadas e realizadas na Clínica do Leite, ESALQ-USP/Piracicaba, SP. Foi considerado normal o leite com ≤ 200.000 CS/mL (LANGONI et al., 2015). Os resultados do presente estudo foram comparados com a IN 62 do Brasil (BRASIL, 2011), vigente para o período de julho de 2014 a junho de 2016, que preconizava valor máximo de 500.000 céls/mL. Dados detalhados do CMT e CCS estão descritos no anexo 1.



Figura 3: Diagnóstico da mastite através do *Califórnia Mastitis Test* (CMT). Fonte: Acervo pessoal.

4.5. Coleta das amostras de leite e fezes de vacas em lactação

Para análise microbiológica do leite um “pool” dos quatro quartos mamários de cada vaca em lactação foi coletado diretamente em frascos estéreis, devidamente identificados, após a antissepsia dos tetos com álcool a 70%. Posteriormente, as amostras de leite foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e transportadas imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para a incubação por 6 h a 37°C. Além disso, na primeira semana de coleta, de cada estação, foram coletadas amostras de fezes diretamente da ampola retal de todas as vacas em lactação seguindo o modelo da técnica de palpação, totalizando 94 amostras que foram acondicionadas em sacos estéreis. Da mesma forma, as amostras de fezes foram encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para isolamento e análise microbiológica.

4.6. Coleta das amostras da linha de ordenha

Foram coletadas 48 amostras da linha de ordenha, sendo 10 amostras das mãos, 10 da cavidade nasal dos 2 ordenhadores da fazenda, 20 da ordenhadeira mecânica e oito da cavidade nasal dos animais de companhia, presentes na sala de ordenha.

As coletas das amostras de mãos e da cavidade nasal dos ordenhadores foram realizadas após os procedimentos da ordenha. Foram utilizados swabs estéreis para as mãos de cada ordenhador, que foram passados nos espaços interdigitais, nos espaços subgueais e sobre as palmas dos mesmos. A coleta das amostras da cavidade nasal dos ordenhadores e dos animais de companhia foi realizada através da introdução de swabs estéreis individuais em movimentos circulares.

As amostras da ordenhadeira mecânica foram coletadas imediatamente após a ordenha, onde os swabs estéreis foram friccionados na superfície interna das teteiras em 20 movimentos circulares para cima, a partir da borda da borracha insufladora e 20 movimentos circulares para baixo, em uma altura de 15 cm (OLIVEIRA et al., 2008).

4.7. Coleta das amostras de água

As amostras de água foram coletadas da propriedade estudada sempre na primeira semana de visita, em cinco pontos distintos sendo: amostras do riacho que eventualmente é utilizado como fonte de água para os animais no pasto, amostra do açude que recebe água de efluentes assim como da chuva e que serve como fonte de água em caso de seca do poço,

amostra de água da torneira situada na sala de ordenha e finalmente do bebedouro disponível para os animais antes e depois da ordenha. Assim, um total de 19 amostras de água foram coletadas, sendo que na coleta de verão houve seca do açude devido à falta de chuva, impedindo a realização da coleta.

Todas as amostras foram armazenadas em frascos âmbar estéreis transportadas sob condições adequadas de refrigeração, ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ para isolamento e análise microbiológica.

4.8. Cepas utilizadas como controle

Como padrão de comparação e de confirmação para os meios de cultura, testes fenotípicos, teste proteômico e PCR realizados neste estudo fez-se necessário a utilização das cepas controle:

- *Escherichia coli* ATCC 25922 – cepa não patogênica comumente usada como controle de qualidade;
- *Escherichia coli* ATCC 35218 – utilizada no estudo como controle positivo para o gene *fimH*;
- *Escherichia coli* K12 derivação C600 – utilizada no estudo como controle positivo para validação dos genes *csgA* e *flu*;
- *Salmonella entérica* subespécie *entérica* sorotipo Braenderup H9812 – marcador universal para técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis*.

4.9. Isolamento bacteriano e testes microbiológicos presuntivos

4.9.1. Leite e Fezes

Para o isolamento de enterobactérias, 0,01mL das amostras de leite e uma alçada das amostras de fezes foram semeadas em placas de Petri contendo meios seletivos de ágar Eosina Azul de Metileno (EMB - HiMedia®) e ágar MacConkey (MC - HiMedia®), incubando-se a 37°C. As leituras das placas foram realizadas após 24 e 48 horas, observando-se a morfologia das colônias onde o resultado mostra-se da seguinte forma: No EMB as colônias fermentadoras de lactose apresentam-se na cor verde brilhante, sendo uma característica da espécie *Escherichia coli* devido a precipitação do sal de telurito. E no MC as colônias fermentadoras de lactose tornam o meio rosa e aquelas não fermentadoras ficam incolores (Figura 4) (KONEMAN et al., 2012; HOGAN & SMITH, 2003).

A seguir, lâminas foram preparadas com esfregaços corados pelo método de Gram, para verificar-se ao microscópio características morfológicas bacterianas. Além disso, foi realizado o teste KOH a 3%, onde a formação de gel viscoso indicou resultado positivo. Posteriormente, realizou-se testes bioquímicos, para a identificação da espécie *E. coli* pertencente à família Enterobacteriaceae (KONEMAN et al., 2012).

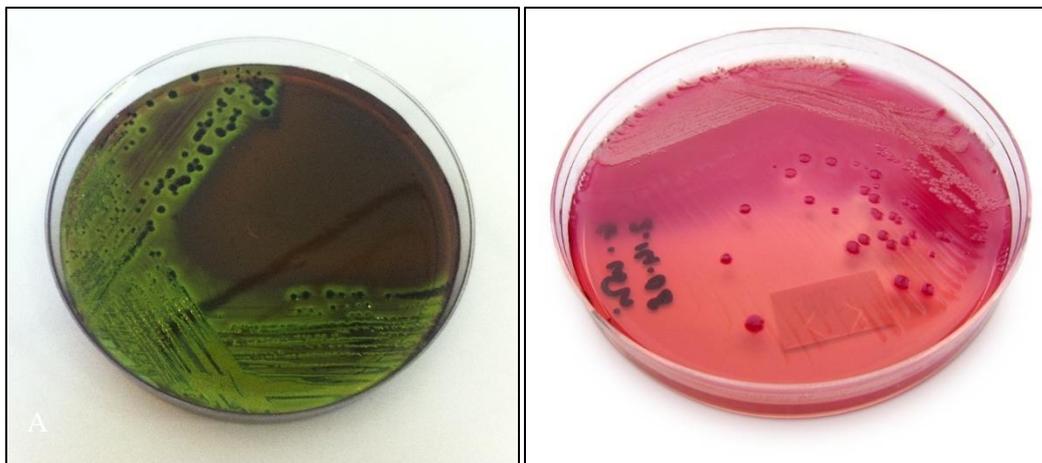


Figura 4: Isolamento primário em meios de cultura seletivo. A - Ágar Eosina Azul de Metileno; B - Ágar Mac Conkey. Fonte: Acervo pessoal e Google.

4.9.2. Água

Para análise de água, utilizou-se a determinação do Número Mais Provável (NMP.mL⁻¹) de coliformes, utilizando a técnica de fermentação dos tubos múltiplos. Alíquotas de 1 mL foram inoculadas em caldo Lauril Sulfato Trypticase (LST) contendo tubos de Durham invertidos e incubados por 48 horas a 35°C. Em seguida, uma alíquota dos tubos positivos (formação de gás nos tubos de Durham e turvação do meio) foi transferido para tubos contendo caldo Lactose Bile Verde Brilhante (LBVB) e caldo EC (*Escherichia coli*) e incubados respectivamente, a 35°C por 48 horas e a 45°C, em banho-maria, por 24 horas (Figura 5). Uma alíquota dos tubos de EC positivos foi semeada nos meios seletivos Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e Mac Conkey, onde incubou-se a 35°C por 24 horas. Após a incubação, as amostras foram submetidas ao mesmo protocolo de caracterização utilizado para amostras de leite e fezes, citados anteriormente (KONEMAN et al., 2012).

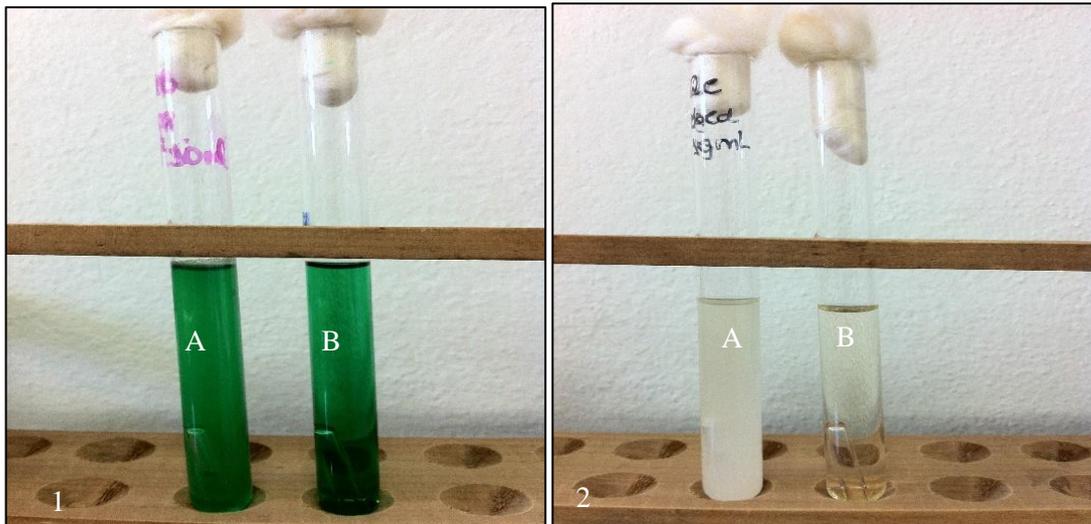


Figura 5: Meios de cultura utilizados na determinação do Número Mais Provável. 1. Caldo Lactose Bile Verde Brilhante. A. Resultado positivo com turvação e presença de bolha no tubo de Durham. B. Branco. 2. Caldo *Escherichia coli*. A. Resultado positivo com turvação e presença de bolha no tubo de Durham. B. Branco. Fonte: Acervo pessoal.

4.10. Identificação de Enterobactérias

Após a identificação presuntiva das colônias, os bastonetes Gram negativos, KOH positivos foram submetidos aos testes bioquímicos (KONEMAN et al., 2012).

4.10.1. Diagnóstico presuntivo através do meio de triagem Kligler Iron Agar

O ágar Kligler Iron (HiMedia®) foi utilizado para detectar a capacidade da bactéria fermentar a glicose e/ou a lactose. Este meio contém glicose em pequena concentração (0,1%), lactose em concentração superior (1%), o indicador de pH vermelho de fenol para detectar a produção de ácidos resultantes da fermentação dos hidratos de carbono, tiosulfato de sódio, substrato para a produção de H₂S (sulfeto de hidrogênio) e sulfato de ferro para a detecção desse produto final. O meio foi inoculado por picada no cilindro e por estria na parte inclinada (rampa). É essencial que as culturas sejam observadas após 18 a 24 horas de incubação para evitar que os hidratos de carbono sejam completamente utilizados e que ocorra degradação das peptonas, formando produtos finais alcalinos. A leitura da fermentação de lactose foi realizada pela mudança de cor da rampa, no fundo do cilindro a da glicose e no meio do cilindro a de H₂S. Após incubação puderam ser determinadas as atividades fermentativas, a produção de gás e a produção de H₂S, sendo a *Escherichia coli* fermentadora de lactose e glicose, produtora de gás e não produtora de H₂S (KONEMAN et al., 2012).

4.10.2. Avaliação do perfil bioquímico

A capacidade da *Escherichia coli* utilizar o citrato como única fonte de carbono foi avaliada através da inoculação dos isolados em ágar Citrato Simmons (VETEC®). Após incubação por 24 horas à 35°C, foi observada a coloração dos tubos, onde a alteração de verde para azul, indicou alcalinização do meio após a utilização do citrato.

A produção de indol (positiva) e sulfeto de hidrogênio (H₂S) (negativa), bem como avaliação da motilidade (positiva) para identificação de *E. coli* foram realizadas em meio ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM – VETEC®). A produção de indol está baseada na formação de um complexo de cor vermelha quando o indol, produzido pela bactéria, reage com o grupo aldeído do p-dimetilaminobenzaldeído (reativo de Kovacs). A motilidade é considerada positiva quando ocorre difusão do microrganismo na zona de inoculação. Na prova positiva para H₂S, as bactérias produzem a enzima redutase do tiosulfato, o qual converte o tiosulfato em sulfito com liberação de sulfeto de hidrogênio, este enegrece a extremidade inferior do meio SIM. A leitura é feita após 24 horas de incubação à 35°C. O resultado obtido é confrontado com o meio Kligler sendo, portanto, considerada a bactéria produtora de H₂S aquela que se apresentou positividade em ambos os testes (KONEMAN et al., 2012).

As provas de Voges-Proskauer (VP) e Vermelho de Metila (VM) foram realizadas através da utilização do caldo MR-VP (VETEC®) que apresenta na sua composição glicose, peptona, água e fosfato. A utilização da glicose, apresentando a produção de acetilmetilcarbinol (acetoína), é indicada pela coloração rosa na prova do VP após a adição de 0,6 mL de α -naftol a 5% e 0,2 mL de KOH (40%) no caldo contendo o inóculo incubado por 24 a 48 horas à 35°C. A prova do VM é utilizada para a detecção de ácidos mistos. É detectado através da viragem da coloração do caldo para vermelho após a adição do reativo vermelho de metila (KONEMAN et al., 2012). Neste caso a *E. coli* é positiva para VM e negativa para VP.

Todos os testes realizados para identificação de *E. coli* estão representados na figura 6.

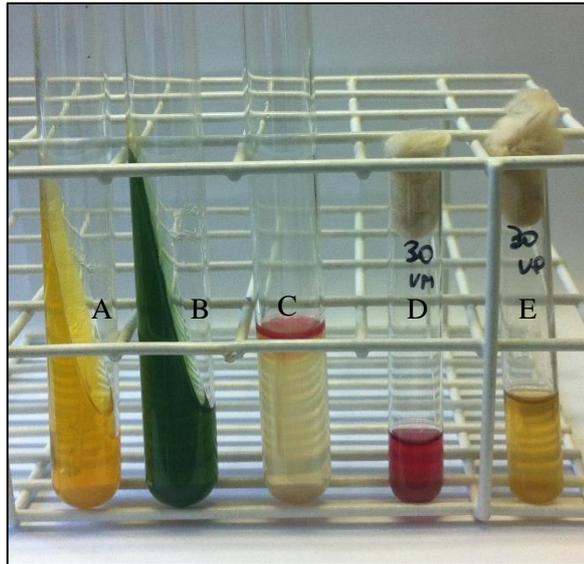


Figura 6: Provas bioquímicas com resultados para identificação de *E. coli* em amostras de leite, fezes, água e cadeia produtiva. A. Kligler. B. Citrato Simmons. C. SIM. D. Vermelho de Metila. E. Voges-Proskauer. Fonte: Acervo pessoal.

4.10.3. Identificação das Enterobactérias por MALDI-TOF MS

Todas as enterobactérias previamente identificadas pelos testes bioquímicos foram avaliadas pela técnica de Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI- TOF MS) como o intuito de confirmar a nível de espécie. Esta técnica foi executada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Para o preparo das amostras, os isolados foram cultivados em ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI) por 24 horas a 37°C. Cada cultura bacteriana foi transferida para a microplaca (96 MSP, Bruker-Billerica, E.U.A) e, ao sedimento bacteriano, foi adicionado uma solução de lise (ácido fórmico 70% Sigma-Aldrich®) em quantidade suficiente para cobri-lo. Em seguida 1 mL de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2, 5%, Sigma-Aldrich®) foi utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectro de massa (MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker®) equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa Flex Control 3.3 (Bruker®).

Os espectros foram coletados na faixa de massa entre 2.000- 20.000 m/s e, posteriormente analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker®), com as

configurações padronizadas para a identificação bacteriana. O programa confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência em um banco de dados.

Os resultados obtidos variam em uma escala que vai de zero a três, sendo que quando maior o valor, mais confiável é a identificação. Neste trabalho, consideram-se como uma identificação aceitável aquelas que apresentam valores iguais ou superiores a dois como proposto pelo fabricante.

Quadro1: Quadro extraído do programa Bruker Daltonik MALDI apresentando o significado dos valores em relação ao *score* obtido na amostra

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	Highly probable species identification ¹	(+++)	green
2.000 ... 2.299	Secure genus identification, probable species identification ²	(++)	green
1.700 ... 1.999	Probable genus identification ³	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	Not reliable identification ⁴	(-)	red

Legenda: 1. Identificação altamente provável das espécies; 2. Identificação Segura do gênero, identificação provável de espécies; 3. Identificação provável do gênero; 4. Identificação não confiável.

4.10.4. Teste fenotípico para avaliação da produção de biofilme em microplaca

Todas as cepas identificadas como *Escherichia coli* foram submetidas quanto a produção de biofilme em microplaca sendo avaliadas qualitativa e quantitativamente através de metodologia proposta por CHRISTENSEN et al. (1985) e CUCARELLA et al. (2001), com modificações padronizadas no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ por MARQUES et al. (2013). As cepas foram repicadas em ágar sangue de carneiro por 24 horas a 35°C, e posteriormente, foram reisoladas em ágar BHI por 24 horas a 35°C para suspensão da colônia em solução salina a uma concentração de 0,5 de acordo com a escala de McFarland. Foram adicionados em microplacas de poliestireno estéreis (com 96 poços) 180 µL de caldo tripticase soja (TSA - Britania) contendo 0,24% de glicose para estimular a produção do biofilme. A seguir, alíquotas de 20 µL desta suspensão foram inoculadas em triplicata e incubadas por 24 horas à 35°C sem agitação. Após incubação, este material foi desprezado e os poços foram lavados 2 vezes com 200 µL de solução salina estéril, secos em estufa por 1 hora a 65°C e corado com 200 µL de safranina 1% por 15 min. Os poços foram lavados três vezes com água destilada e secos à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada à 490 nm

em leitor de ELISA (BIO RAD MODEL 680). Poços não inoculados contendo caldo TSA com 0,24% de glicose serviram como branco. Os testes foram realizados em triplicata e uma média foi retirada dos valores obtidos. Foram consideradas produtoras de biofilmes cepas com absorbância medidas maiores que 0,1 (MACK et al., 2000; VASUDEVAN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006). A produção de biofilme foi considerada forte, moderada ou fraca, conforme mostrado no quadro 1.

Quadro 2: Classificação da produção de biofilme pelo método da microplaca

Produção de biofilme	Absorbância
Fraca	0,1 > 0,2
Moderada	0,2 > 0,3
Forte	> 0,3

4.10.5. Sorotipagem

Cepas identificadas bioquimicamente e por MALDI-TOF MS como *E. coli* foram encaminhados para o Laboratório de Referência de Enteroinfecções Bacterianas (LRNEB/IOC FIOCRUZ) da Fiocruz, Rio de Janeiro, onde os sorotipos O:H foram determinados por meio da metodologia de EWING, 1986 no qual ensaios de aglutinação padrão em tubos utilizou-se antissoro adsorvido para os antígenos somático O157 e flagelar H7.

4.11. Detecção genotípica

4.11.1. Extração de DNA total bacteriano

O DNA das cepas de *E. coli* foi extraído utilizando a metodologia de lise térmica segundo BUYUKCANGAZ et al. (2013) com modificações estabelecidas pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ. Cada cepa foi cultivada em 1,5 mL de caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI - Kasvi®) por 24 horas a 35°C. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados por 2 minutos a 13.500 ge o sobrenadante descartado. As células foram ressuspendidas em 200 µL de água ultrapura e agitada em vórtex, sendo então incubadas por 10 minutos a 100°C. Após o tempo estipulado, os microtubos foram esfriados em temperatura ambiente e centrifugados por 2 minutos a 13.500 g. Aproximadamente 180 µL do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos de (600 µL). Depois disso, os microtubos foram armazenados a temperatura de -20°C.

4.11.2. Amplificação do gene 16S rDNA e do gene *gyrB* por PCR

Após a extração rápida do DNA genômico bacteriano, a identificação das cepas foi confirmada através da amplificação da região 16S do rDNA (27f e 1512r) de bactérias gerando um fragmento de aproximadamente 1500 pb pela técnica de Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) para caracterizar qualitativamente o DNA bacteriano.

As concentrações utilizadas nas reações foram: 2 µL de tampão 10X (10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl e 0.1% Triton X-100), 2,0 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTP (Fermentas) e 1U de Taq polimerase (Fermentas), em um volume total de reação de 20 µL contendo 20 ng do DNA extraído. Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e revelados com o corante SYBR Green (Invitrogen), possibilitando a visualização em luz ultravioleta e documentação dos *amplicons* pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação, utilizando o marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). Posteriormente, alguns representantes de *Escherichia coli* foram submetidas a mesma técnica para amplificação do gene *gyrB* (UP1 e 181r) gerando um fragmento de 700 pb e então sequenciadas para confirmação da espécie baseada em estudos moleculares (Quadro 3). Os produtos de PCR utilizados para sequenciamento foram purificados utilizando a Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante. Ambas as fitas foram seqüenciadas pela empresa Helixxa, Campinas para confirmação das seqüências e assegurar fidelidade.

As seqüências foram editadas utilizando o programa Bioedit (HALL et al., 1999) e foram comparadas com outras seqüências depositadas neste banco de dados do NCBI (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997). Estas foram importadas para o programa MEGA versão 7.0 (KUMAR et al., 2004), e alinhadas utilizando o programa Clustal W (HIGGINS et al., 1994).

Quadro 3: Descrição dos *primers* utilizados para amplificação da região 16S rDNA bacteriano e do gene *gyrB* para as estirpes de Enterobactérias

Gene alvo	Primers	Sequência (5'-3')	Referência
16s rDNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	SUZUKI & GIOVANNONI, 1996
	1512R	ACGGCTACCTTGTTACGACT	KANE et al., 1993
<i>gyrB</i>	UPI	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNNGGNGG NAARTTYGA	YAMAMOTO & HARAYAMA, 1995
	181R	CAGGAAACAGCTATGACCARRTGNGTNCNCC	KASAI et al., 1998

Ciclo: 94°C 5min (94°C 1min; 65°C 1min; 72°C 1min) x30, 72°C 5min.

4.11.3. Detecção de genes de virulência para formação de perfis

Utilizando a metodologia descrita anteriormente no capítulo 4.10.2, as cepas de *E. coli* foram submetidas a técnica de PCR para detecção de genes de virulência, no qual os resultados foram utilizados para formar perfis baseados no padrão de virulência determinados para selecionar cepas usadas na técnica *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Todas as 152 cepas de *E. coli* foram investigadas por marcadores moleculares como: intimina (*eaeA*), presença da toxina Shiga (*stxI* e *stxII*), enterotoxinas termolábeis (*LT*) e termoestáveis (*ST*), invasividade (*ial*) e *E. coli* enteroagregativa (*eagg*) relacionados a produção de toxinas. Além disso, foram analisados genes associados a aderência como: fimbria F1 (*fimH*), fimbria curli (*csgA*) e antígeno 43 (*flu*). As sequências de base e os tamanhos previstos dos produtos amplificados para os *primers* específicos utilizados são apresentados na Quadro 4.

Quadro 4: Descrição das sequencias de *primers* para amplificação de genes de virulência utilizados para formação de perfis genéticos

Genes alvos	Sequência (5'3')	Fragmento (pb)	Referência*
<i>iaeA</i>	AGGCTTCGTCACAGTTG CCATCGTCACCAGAGGA	570	CHINA et al., 1996
<i>stxI</i>	AGAGCGATGTTACGGTTTG TTGCCCCCAGAGTGGATG	388	CHINA et al., 1996
<i>stxII</i>	TGGGTTTTTCTTCGGTATC GACATTCTGGTTGACTCTCTT	807	CHINA et al., 1996
<i>ST</i>	ATTTTTCTTTCTGTATTGTCTT CACCCGGTACAAGCAGGATT	190	LOPEZ-SAUCEDO et al., 2003
<i>LT</i>	GGCGACAGATTATACCGTGC CGGTCTCTATATTCCCTGTT	450	LOPEZ-SAUCEDO et al., 2003
<i>ial</i>	GGTATGATGATGATGAGTCCA GGAGGCCAACAAATTATTCC	650	LOPEZ-SAUCEDO et al., 2003
<i>eagg</i>	AGACTCTGGCGAAAGACTGTATC ATGGCTGTCTGTAATAGATGAGAAC	194	PASS et al., 2000
<i>fimH</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	JOHNSON & STELL, 2000
<i>flu</i>	CCGGCGGGCAATGGGTACA CAGCTCTCACAATCTGGCGAC	707	RESTIERI et al., 2007
<i>csgA</i>	GATCTGACCCAACGTGGCTTCG GATGAGCGGTTCGCGTTGTTACC	178	SILVA et al., 2014

*Ciclos

4.11.4. Amostras selecionadas para técnica desenvolvida na Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC)

Durante o período de 01 de setembro de 2015 a 24 de janeiro de 2016, foram desenvolvidas atividades pertinentes ao Programa Doutorado Sanduíche na Argentina no Laboratório de Microbiologia Genética da Universidad Nacional de Río Cuarto sob a orientação da professora Mirta Lasagno e coorientação da professora Elina Reinoso. Para estas análises, foram selecionados inicialmente 30 cepas de *E. coli* de modo a considerar a representatividade de todos os perfis de virulência previamente estabelecidos para a realização da técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) baseada no protocolo da CDC (*Center of Disease Control and Prevention*), 2013 com modificações (Anexo 2).

4.11.4.1. Preparo da célula para *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE)

Cada cepa bacteriana foi semeada em ágar Caseína Trypticase de Soja (TCS) e incubadas a 37°C por 16-18 horas. Células foram removidas da placa com alça de platina estéril e inseridas em tubos contendo 2 mL de buffer de suspensão celular (CSB) (100mM Tris-HCl 100mM EDTA pH 8) para serem analisadas por espectrofotômetro e ajustadas a 610 nm (DO<1) que corresponde a 1 na escala de McFarland. A suspensão de células padronizada (245

µL) foi transferida para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e a proteinase K (solução-estoque de 20 mg/mL) foi adicionada a uma concentração final de 1 mg/mL e homogeneizadas por pipetagem. Um volume igual de 2% de Agarose de Baixo ponto de Fusão (BRL®) fundido preparado em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) e mantido a 50°C foi adicionado à suspensão celular e misturado pipetando suavemente para cima e para baixo várias vezes. A mistura foi transferida para dois moldes reutilizáveis (Molde Bio-Rad, Hercules, CA) e mantidos a 4°C durante 20 minutos. Os blocos de agarose foram transferidos para tubos cônicos de 2 mL contendo 1275 µL de tampão de lise I (50 mM de Tris, 50 mM de EDTA, pH 8,0 e 1% de lauril sarcosina de sódio) e 75 µL de proteinase K (solução-estoque 20 mg/ml) incubadas a 50°C durante 90 minutos num banho de água. A solução tampão de lise foi removida e os blocos foram lavados duas vezes com água em Banho Maria a 50°C durante 15 minutos. Depois, foram lavados com 10 mL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) durante 4 vezes a 50°C durante 15 minutos em banho maria e depois armazenados em 10 mL de tampão TE a 4°C.

4.11.4.2. Digestão de DNA genômico em blocos de agarose

A digestão enzimática foi feita por adição de um fragmento do bloco de agarose em microtubos contendo tampão de restrição (2 µL de BSA, 20 µL de Tampão 10X, 74 µL de água livre de nuclease e 4 µL de enzima de restrição *Xba*I). A restrição com *Xba*I (Promega®) foi feita a uma concentração de enzima de 10 U por tampão durante um tempo de corte de 1,5 hora a 37°C.

4.11.4.3. Eletroforese e coloração do gel de agarose

A técnica PFGE foi realizada com o sistema CHEF DR-III (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os fragmentos de restrição de DNA em blocos foram separados por eletroforese através de gel de Agarose SeaKem a 1% (SIGMA Chemical Company, EUA) em solução 0,5 X de tampão Tris-borato-EDTA (preparado por diluição de 10X TBE). Os parâmetros eletroforéticos utilizados foram os seguintes: tempo de comutação inicial, 2,2 s; Tempo de comutação final, 54,2 s; Tempo de execução, 19 h; Ângulo, 120°; Gradiente, 6,0 V/cm; Temperatura, 14°C. Após eletroforese, os géis foram corados durante 30 minutos em 150 mL de uma solução 0,5X de Tris-borato-EDTA contendo 6 mL de brometo de etídio 10 mg / mL. Um padrão de tamanho molecular (*Salmonella entérica* subespécie *entérica* sorotipo Braenderup H9812) foi utilizado como um marcador proposto pela CDC (*Center of Disease*

Control and Prevention) PFGE em cada experimento juntamente com os isolados de *E. coli* a serem testados (ROMERO et al., 2004).

4.11.4.4. Análise dos perfis eletroforéticos

A similaridade foi analisada de acordo com o protocolo da Pulsenet. Os padrões de macrorestrição com *Xba*I foram observados com o software BioNumerics 6.0 (Applied Maths, A., Belgium) utilizando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e o coeficiente de Dice interpretados conforme TENOVER et al. (1995). Na comparação da similaridade entre clusters aplicou-se 1,5% na tolerância de corte. Esta análise foi gentilmente realizada na Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Agrobiologia em Seropédica.

4.12. Análise baseada em *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

As cepas de *E. coli* que apresentaram de 95% a 100% de similaridade genética (n=10) através do PFGE foram submetidas à técnica de MLST, de acordo com o esquema de Achtman utilizando sequencias de sete genes *housekeeping* que foram sequenciados a fim de estabelecer uma relação filogenética entre elas (Quadro 5) (WIRTH et al., 2006).

Quadro 5: Descrição das sequencias de *primers* para amplificação de sete genes *housekeeping* utilizados na técnica MLST.

<i>Primers</i>	Sequência (5'3')	Fragmentos (pb)	Temp. Anelamento
<i>adkF</i>	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583	62°C
<i>adkR</i>	CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
<i>fumCF</i>	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	60°C
<i>fumCR</i>	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
<i>gyrBF</i>	TCGGCGACACGGATGACGGC	911	65°C
<i>gyrBR</i>	ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
<i>icdF</i>	ATGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	878	65°C
<i>icdR</i>	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>mdhF</i>	ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG	932	54°C
<i>mdhR</i>	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT		
<i>purAF</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816	60°C
<i>purAR</i>	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
<i>recAF</i>	CGCATTCGCTTTACCCTGACC'	780	60°C
<i>recAR</i>	TCGTCAAATCTACGGACCGGA		

Ciclo: 95°C 2min, (95°C 1min, XC° 1min, 72°C 1min)x30, 72°C 5min

Para o sequenciamento, os produtos de PCR purificados utilizando a Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante e ambas as fitas de DNA foram seqüenciadas pela empresa Helixxa, Campinas para confirmação das seqüências e assegurar fidelidade. As seqüências foram editadas no programa Bionumerics 6.0 e para elucidar ainda mais as relações genéticas entre as cepas, os dados de seqüência do MLST concatenados foram alinhados usando CLUSTAL-W implementado no programa MEGA 7.0 (HALL et al., 1999; KUMAR et al., 2004). Com base nos dados do alelo, a árvore de extensão mínima foi construída usando o algoritmo PHILOVIZ (<http://www.phyloviz.net/>) (FRANCISCO et al., 2012). Procedimentos, *primers* e atribuição de tipo de seqüência (ST) foram descritos no site do PubMLST (<http://pubmlst.org>). O site EnteroBase (<http://enterobase.warwick.ac.uk>) foi utilizado para observar a ocorrência dos STs encontrados no presente estudo no Brasil.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação de *Escherichia coli*

A partir do total de 444 amostras coletadas dentro do ambiente de produção leiteira, foram isoladas 183 enterobactérias, sendo 25,7% (47/183) de leite bovino, 51,3% (94/183) das fezes destes animais, 12,5% (23/183) de água e 10,3% (19/183) da cadeia produtiva. Todas as cepas foram submetidas às identificações fenotípicas e MALDI-TOF MS e ambos os procedimentos identificaram em espécie (Gráfico 1). As amostras de água dos diferentes pontos da coleta (poço, açude, bebedouro, torneira e riacho) foram submetidas a análise do Número Mais Provável (NMP - Anexo 3), que revelou todas as amostras em todas as estações apresentaram padrões de potabilidade superiores aos estipulados pelo Ministério da Saúde (Tabela 1) (BRASIL, 2004).

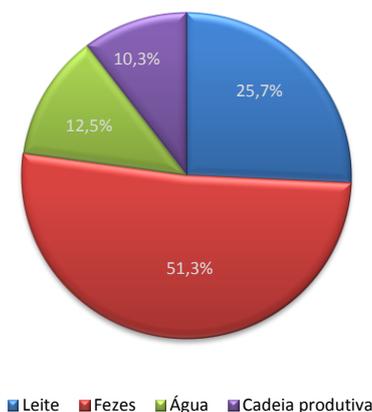


Gráfico 1: Percentual de Enterobactérias encontradas nas amostras estudadas.

Tabela 1. Média do Número Mais Provável de Coliformes Totais e Termotolerantes das amostras de água coletadas nas quatro estações

Pontos de coleta	Coliformes Totais (NMP/100mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/100mL)
Poço	907	226
Açude	1103	52
Bebedouro	875	432
Torneira	1250	110
Riacho	1208	945

As amostras de água oriundas do riacho obtiveram valores significativamente altos para coliformes totais e termotolerantes. Na propriedade estudada, o riacho era utilizado como fonte de água para os animais durante o pastejo. Em área rural as principais fontes de abastecimento de água são os poços rasos, açudes e riachos, sendo suscetíveis à contaminação por estarem

próximas a fossas e as áreas de pastagem ocupadas pelos animais (MIGUEL, 2010). A *E. coli* é onipresente no ambiente de produção leiteira porque é excretada maciçamente com as fezes, sendo amplamente utilizada como indicador de contaminação fecal em corpos d'água. O contato externo e a ingestão subsequente dessa bactéria podem causar efeitos prejudiciais à saúde (MONEY et al, 2009).

Das cepas pertencentes à família Enterobacteriaceae, 152 (83%) foram identificadas pelas técnicas utilizadas como *E. coli*. Destas 152 cepas, 23% (35/152) foram encontradas nas amostras de leite e 5,2% (8/152) presentes na cadeia produtiva. Um total de 9,8% (15/152) das amostras de água apresentou positividade para presença de *E. coli* no riacho que passa dentro da propriedade e como já era esperado, esta espécie esteve presente em 100% das amostras de fezes (Gráfico 2).

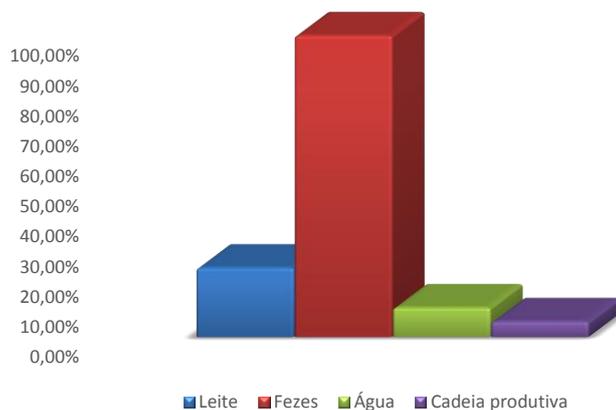


Gráfico 2: Percentual de cepas de *E. coli* dentro do ambiente de produção leiteira.

O perfil bioquímico de *E. coli* é muito característico tendo como sua principal importância a sua capacidade para a fermentação da lactose, além do indol positivo, H₂S e citrato negativo, o que justifica o maior nível de concordância do método fenotípico em confronto com o MALDI-TOF MS. Em adição, nove cepas cuja identificação foi concordante também tiveram o gene *gyrB* sequenciado como controle, no qual apresentaram até 99% de máxima identidade com cepas de *E. coli* depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados do sequenciamento do gene *gyrB* em *E. coli* identificadas pelos testes fenotípicos e MALDI-TOF MS

Amostras	Identificação bioquímica	Identificação MALDI	Identificação BLASTn	Acesso NCBI	Máxima identidade	E-Value
N65	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CP013253.1	99%	0.0
N22	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	KF914219.1	98%	0.0
N57	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CP013253.1	92%	0.0
N64	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CP013253.1	97%	0.0
F56	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CP013253.1	98%	0.0
A21	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	DQ386875.1	96%	0.0
A24	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CP011018.1	96%	0.0
A16	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CP011331.1	99%	0.0
A16	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CP011331.1	99%	0.0

Escherichia coli tem sido isolada de leite bovino em vacas pertencentes a fazendas leiteiras com sistemas intensivos de produção de leite. Mais de 700 tipos antigênicos ou sorotipos desse microrganismo foram reconhecidos com base em antígenos O, H e K, além da distinção em duas classes de coliformes: cepas que são inofensivas (cepas não patogênicas) e cepas que causam uma grande variedade de infecções clínicas típicas (cepas patogênicas). Sendo desta forma considerada um dos melhores e mais estudados os organismos de vida livre, a *E. coli* é capaz de viver como comensal de maneira inofensiva na microbiota intestinal de homens e animais (BOGNI et al., 2011). Em relação a animais de produção, essa bactéria pode causar infecção e inflamação da glândula mamária em vacas leiteiras principalmente no momento do parto e durante a lactação inicial que atinge sintomas clínicos sistêmicos locais e, por vezes, graves. Os sinais clínicos variam de formas muito graves, mesmo fatais ou mastite leve, onde as vacas têm apenas sinais locais no úbere (BOGNI et al., 2011). No presente estudo não foram relatados casos clínicos de mastite causada por *E. coli* e isso pode estar relacionado ao fato de que a mastite ocasionada por esse microrganismo apresenta em alguns casos curta duração, com aproximadamente 70% dos casos com duração menor que 10 dias e menos de 2% apresentam duração superior a 100 dias (SMITH et al., 1985; RADOSTITS et al., 2000). BLUM et al. em 2014 avaliaram os efeitos de longo prazo de infecções intramamárias causadas por *E. coli* associadas com diversas apresentações clínicas sobre a produção e a qualidade do leite. Dois perfis de inflamação foram identificados durante o estudo: “inflamação de curta duração”, caracterizada pela redução inferior a 15% na produção diária de leite e menos de 30 dias para retornar à produção normal; e, “inflamação de longa duração”, caracterizada por redução superior a 15% da produção diária de leite e mais de 30 dias para atingir nova produção máxima de leite. A CCS de vacas que apresentaram inflamação de curta duração retornaram ao normal em 28 dias após o diagnóstico da mastite clínica (Figura 7).

Nossas coletas foram realizadas em épocas específicas, o que pode ter corroborado para não encontrar quadros de mastite clínica, podendo esta ter sido de curta duração, neste caso os ordenadores deveriam ter sido treinados para realizar uma coleta de leite ao observar os primeiros sintomas da enfermidade no animal e posteriormente acondicionar as amostras em temperatura de congelamento para que pudesse ser feito a identificação microbiológica.

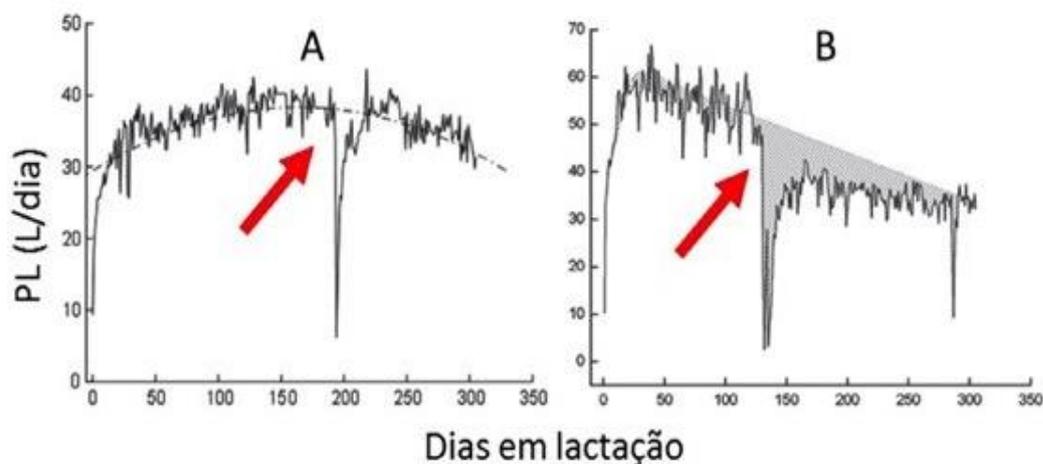


Figura 7: Curva de lactação de uma vaca caracterizando o perfil de inflamação de curta duração (A) ou de inflamação de longa duração (B). A área marcada em cinza ilustra a perda de produção devido à infecção intramamária. As setas vermelhas indicam o início da infecção intramamária clínica causada por *E. coli*. (Fonte: Adaptado de BLUM et al., 2014).

No entanto, as cepas patogênicas de *E. coli* representam um grupo diversificado de agentes fenotipicamente patogênicos. Um único método ou abordagem não pode ser utilizada para detectar ou isolar todos os patótipos de interesse. Conseqüentemente, muitos métodos diferentes têm sido desenvolvidos para detectar especificamente ou isolar certos sorotipos (LYNCH et al, 2012).

5.2. Produção de biofilme e detecção de genes de virulência de *E. coli* através da técnica de PCR

Considerando a produção de biofilme e a intensidade desta produção como sendo em fraca, moderada e forte produtora, foi possível observar que um total de 41,44% (63/152) das cepas de *E. coli* foram produtoras de biofilme, sendo 37,5% (57/152) fraca produtoras, 1,31% (2/152) produtoras moderadas e 2,63% (4/152) fortes produtoras (Figura 8 – Anexo 4). Isso sugere que estas cepas possuem um alto potencial de adesão ao tecido glandular mamário. Ao avaliar a produção de biofilme em cepas de *E. coli* uropatogênicas, TADEPALLI et al., 2016 observaram que 35% eram produtoras, corroborando com o presente trabalho. Dados similares

foram encontrados por SAYAL et al., 2017 quando observaram 53% de cepas bacterianas uropatogênicas produtoras de biofilme dentre elas *E. coli* através do método de tubos. A descrição do percentual da produção de biofilme por amostra encontra-se na tabela 3.

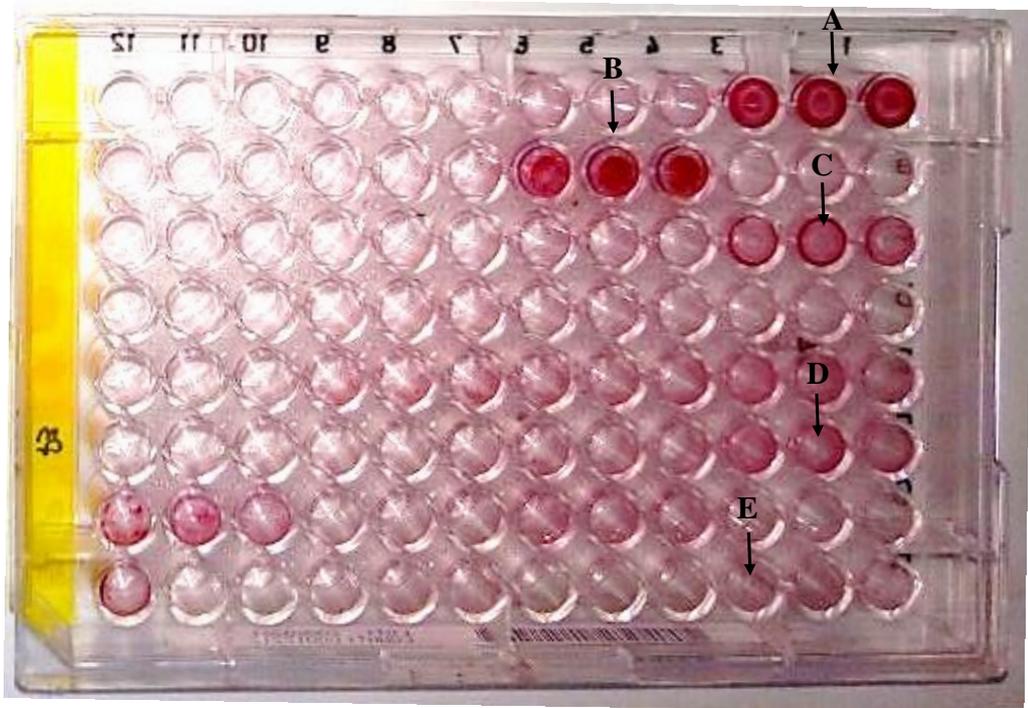


Figura 8: Técnica da microplaca revelando a produção de biofilme por *E. coli* isolada de ambiente de produção. A – cepa controle, B – cepa forte produtora, C – cepa produtora moderada, D – cepa fraca produtora, E – cepa não produtora.

Tabela 3: Percentual de produção de biofilme por amostra coletada

Cepas produtoras de biofilme (%)	Amostras (n/152)	Percentual
Fracas (37,5%)	Leite (15/152)	9,86%
	Cadeia produtiva (6/152)	3,94%
	Água (10/152)	6,57%
	Fezes (26/152)	17,10%
Moderadas (1,31%)	Leite (1/152)	0,65%
	Fezes (1/152)	0,65%
Fortes (2,63%)	Fezes (4/152)	2,63%

Dos genes de virulência avaliados, os relacionados com a produção de biofilme *fimH*, *csgA* e *flu* foram prevalentes nas cepas de *E. coli* dentro do ambiente de produção leiteira.

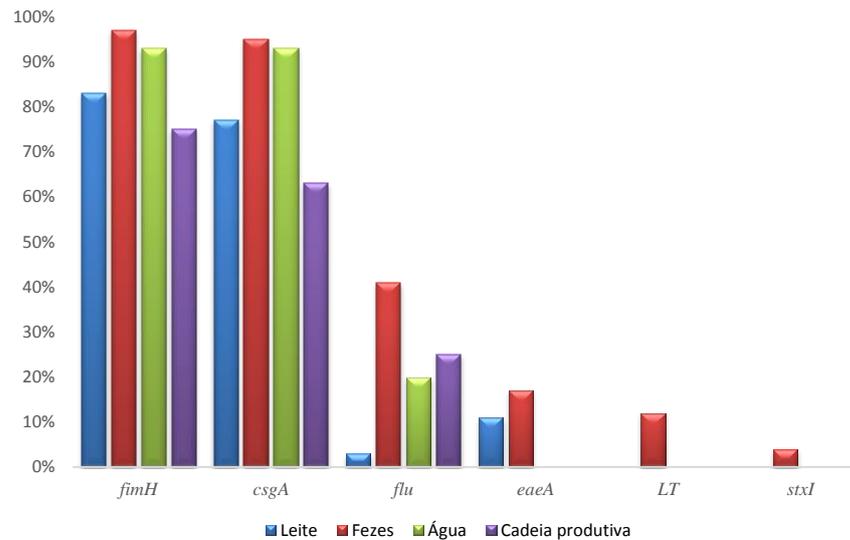


Gráfico 3: Percentual dos genes de virulência avaliados.

As cepas apresentaram um percentual total de 92,1% (140/152) para o gene *fimH* sendo encontrados nas fezes 96,8% (91/94) seguidos de 93,3% (14/15) oriundos da água, 82,8% (29/35) do leite e 75% (6/8) da cadeia produtiva. Em relação ao gene *csgA* as cepas apresentaram 88,8% (135/152) dos quais, 94,6% (89/94) foram isoladas nas fezes, 93,3% (14/15) na água, 77,1% (27/35) no leite e 62,5% (5/8) na cadeia produtiva. O percentual total da presença do gene *flu* nas cepas estudadas foi 29,6% (45/152), sendo 41,4% (39/94) oriundos das fezes, 25% (2/8) da cadeia produtiva, 20% (3/15) da água e 2,8% (1/35) do leite.

Segundo NASCIMENTO et al. (2014) uma distribuição variada de genes relacionados às adesinas fimbriais e afimbriais já foram relatadas na literatura sendo associada à formação de biofilmes entre estirpes de EPEC atípicas. O mesmo autor ao associar a formação de biofilme e genes relacionados à adesina em isolados clínicos de cepas atípicas de EPEC observou que os genes *fimA* / *fimH* foram identificados em 73% das cepas, enquanto os genes relacionados a fimbria curli (*csgA* e *crl*) foram identificados em 45% das EPECs, já o gene *flu* no qual está relacionado às proteínas autotransportadoras Ag43 foi encontrado em 24% das cepas estudadas.

HERNANDES et al. (2011) demonstram que as cepas de EPEC abrigam vários operons de pili que podem favorecer a colonização do hospedeiro e a sobrevivência no meio ambiente. Além disso, outros estudos apontam a capacidade de formação do biofilme em cepas de ETECs, no qual torna-se um risco potencial na higiene alimentar, além de se tornar uma fonte de contaminação cruzada em ambientes agrícolas e de processamento de alimentos (VOGELEER et al., 2016).

A presença dos genes de virulência associados à formação de biofilme nas cepas do presente estudo pode ser o fator contribuinte para a dispersão desse microrganismo no ambiente

de produção avaliado. Pesquisadores relataram que a dispersão pode ser promovida pela interação entre a formação de biofilmes e a transferência horizontal de genes, sendo este um processo onde um microrganismo transfere material genético para outra célula que não é sua descendente (MADSEN et al., 2012). Alta frequência do gene *fimH*, está associada a infecções intramamárias persistentes, onde a *E. coli* uropatogênica é capaz de aderir, invadir e sobreviver dentro de células epiteliais mamárias cultivadas. FERNANDES et al. (2011), mostrou uma prevalência de 100% desse gene em isolados de mastite ocasionada por *E. coli*.

De acordo com MADSEN et al. (2012), tanto a formação de biofilmes, como a transferência horizontal de genes tem sido principais temas de pesquisa em microbiologia mostrando sua relevância para adaptação e evolução bacteriana. Os autores observaram que a estrutura e as funções de plasmídeos e biofilmes estão interligadas através de numerosas interações complexas como nível comunitário e genético, o que aponta para a participação desses mecanismos na evolução bacteriana e mostrando sua relevância sobre essa evidência da relação entre a transferência horizontal de genes e formação de biofilmes. A premissa de interconexão entre essas duas vertentes é que a conjugação ocorre com mais frequências e então os biofilmes aceleram a propagação de elementos genéticos móveis. Isso acontece através de uma vantagem espacial e estrutural, mantendo o pilus conjugativo intacto. Além disso, a frequente transferência horizontal de plasmídeos móveis podem ser um dos motivos pela persistência do microrganismo como parasitas moleculares (HAUSNER & WUERTZ, 1999; SORENSEN et al., 2005).

Da mesma forma, foi demonstrado em estudos com *E. coli* e *Lactococcus lactis* que a transferência horizontal de genes dentro da comunidade de biofilme pode introduzir novas dinâmicas, devido ao aumento da expressão de fatores de aglomeração simultaneamente como transmissão de plasmídeo que também pode cooperar com a formação de biofilmes por seus novos hospedeiros (GHIGO, 2001; LUO et al., 2005). Em estudo realizado por GHIGO (2001), foi possível observar que quando plasmídeos conjugativos naturais foram inseridos em diferentes hospedeiros, estes expressaram diferentes tipos de pili conjugativo que conferiu efeito estimulador na formação de biofilme de *E. coli* K-12. Esses resultados foram apoiados por REISNER et al. (2006), que observaram que, as estirpes de *E. coli* que alojavam plasmídeos conjugativos naturais eram mais frequentes na formação de biofilmes. Os autores acreditam que a expressão do pilus conjugativo ocorre no início da formação do biofilme, mas parece que o pilus não é a estrutura principal que facilita diretamente a aderência da superfície celular. Esse processo está sendo iniciado principalmente pela ativação do sistema de biofilme hospedeiro

(MADSEN et al., 2012). Isso também foi relatado por MAY & OKABE (2010), que discutiram a expressão de ácido colônico e da fimbria curli em *E. coli* induzida pelo plasmídeo natural *incF*. O pilus conjugativo permite o contato célula-célula enquanto a indução da produção de ácidos promove a aderência da superfície celular à coesão global e à estrutura do biofilme.

Considerando os genes relacionados à produção de toxinas, pode-se observar que o gene *eaeA* esteve presente em 13,1% (20/152) das cepas estudadas, dos quais 17% (16/94) foram detectados nas fezes e 11,4% (4/35) no leite. Os genes *LT* 7,2% (11/152) e *stxI* 2,6% (4/152) foram encontrados apenas nas fezes com os respectivos percentuais 11,7% (11/94) e 4,2% (4/94). Não foi possível a detecção de outros genes relacionados a produção toxinas *stxII*, *ST*, *ial*, *eagg* nas cepas testadas. Embora essas cepas não tenham sido classificadas através da caracterização antigênica, a detecção dos genes *eaeA* e *stxI*, respectivamente, podem confirmar a presença dos patótipos EPEC e STEC/EHEC circulando no rebanho leiteiro (MATIAS et al., 2016). A maioria das cepas STEC de bezerro que também produzem lesões *attaching-effacing* (A/E) compreendem alguns sorotipos como O5: H-, O26: H11, O111: H- e O118: H16. Sendo o sorotipo O26: H11 mais comum também entre EPEC de bezerro (MAINIL & FAIRBROTHER, 2014). Além disso, as cepas STEC não-O157 pertencentes a outros sorogrupos, incluindo O26, O91, O103, O111, O128 e O145, foram relatadas em leite e produtos lácteos podendo causar doenças graves em seres humanos (HUGHES et al., 2006; AHMED & SAMER, 2017). No entanto, a maioria dos sorotipos que infectam bezerros ainda não foram identificados (MAINIL & FAIRBROTHER, 2014). De acordo com PIAZZA et al. (2010), a sorologia define o sorogrupo ou sorotipo de uma estirpe, mas raramente os marcadores sorotípicos são suficientes para identificar uma estirpe uma vez que não há relação entre estes e virulência.

Embora o gene *LT* tenha apresentado um percentual de ocorrência mais elevado entre as cepas que o gene *stxI* no presente estudo, várias literaturas têm mostrado a presença dos genes *eae* e *sxt* em uma gama de hospedeiros (BIBBAL et al., 2013; SAMANTHA et al., 2015; GONZALEZ et al., 2016; THIRY et al., 2017).

HERRERA-LUNA et al. (2009) contatou que 15,2% de suas amostras carregavam o gene para toxina Shiga: *stxI*, *stxII* separadamente ou ambos em fezes de bezerro. O gene *stxI* foi identificado com mais frequência do que o gene *stxII*, com 12,2% e 7,8%, respectivamente. A presença do gene de virulência *eaeA* também foi confirmada em amostras positivas para a toxina Shiga, em cepas presentes em bezerros com diarreia (57,1%) e em bezerros saudáveis (19,1%).

O presente estudo corrobora com NORMAN et al. (2015) que ao analisar a filogenia dos genótipos revelou vários padrões interessantes sobre determinados perfis gene de virulência. Na árvore de neighbor-joining, sete conjuntos de cepas do sorotipo O26 em dois ramos distintos mostraram que a maioria das cepas O26 no agrupamento 1 carregavam apenas *stxI*, e no agrupamento 4 outras cepas O26 foram portadoras dos genes *eae* e *stxI*, enquanto uma única cepa apresentava o gene *stxII*. Outro estudo semelhante foi realizado por TAVAKOLI & POURTAGH em 2017 ao identificar genes de virulência em cepas de *E. coli* isoladas de leite mastítico no Irã. Nos resultados de PCR, o gene *eaeA* combinado com *stxI* foram detectados em 53% das cepas de STEC e apenas uma cepa apresentou o gene *stxII* porém juntamente com *stxI* (7%). Investigações sobre amostras de leite mastítico realizadas por SEYDA et al. (2014) demonstraram que o gene *stxI* era o fator de virulência predominante com uma prevalência de 31% em isolados de vacas com mastite.

A adesina intimina e as toxinas Shiga são consideradas como os fatores de virulência mais críticos de *E. coli* O157: H7, envolvidos no desenvolvimento da Síndrome Hemolítico Urêmica e lesões AE, respectivamente (GYLES, 2007). Dados mostraram diferenças nos resultados clínicos da doença e toxicidades das variantes de toxina Shiga em diferentes culturas de células, enquanto que as variantes de intimina demonstraram afetar o tropismo do tecido e conseqüentemente, o local de colonização (FRIEDRICH et al., 2002; LEFEBVRE et al., 2009; FITZHENRY et al., 2002; MUNDY et al., 2007).

A identificação de fatores de virulência de *E. coli* isolada da mastite clínica bovina já foi realizada em investigações anteriores (WENZ et al., 2006). Esses estudos demonstraram que a adesina intimina e as toxinas Shiga, codificadas pelos genes de virulência *eae* e *stxI/stxII*, respectivamente, são mais significativos nas cepas de *E. coli* isoladas da mastite clínica bovina (MOMTAZ et al., 2012)

No presente estudo foram gerados 18 perfis de virulência a partir dos resultados de todas as cepas de *E. coli* levando em consideração os genes de virulência relacionados a toxinas e formação de biofilme, conforme explícito no anexo 2.

5.3. Análise através da técnica PFGE

A análise de agrupamento foi realizada com base nos 18 perfis dos genes de virulência selecionando 30 isolados de forma aleatória, porém obtendo pelo menos um representante de cada perfil e considerando a máxima distribuição desse microrganismo nos diferentes pontos de coleta, sendo eles: fonte animal (leite e fezes), água (torneira e poço), cadeia produtiva (cães,

ordenhador e teteira). Os únicos pontos ausentes foram: açude, bebedouro e riacho. Os padrões de digestão com a enzima *Xba*I foram avaliados para determinar a relação clonal de cepas de *E. coli* no ambiente de produção leiteira entre 2014 e 2015 (Figura 9).

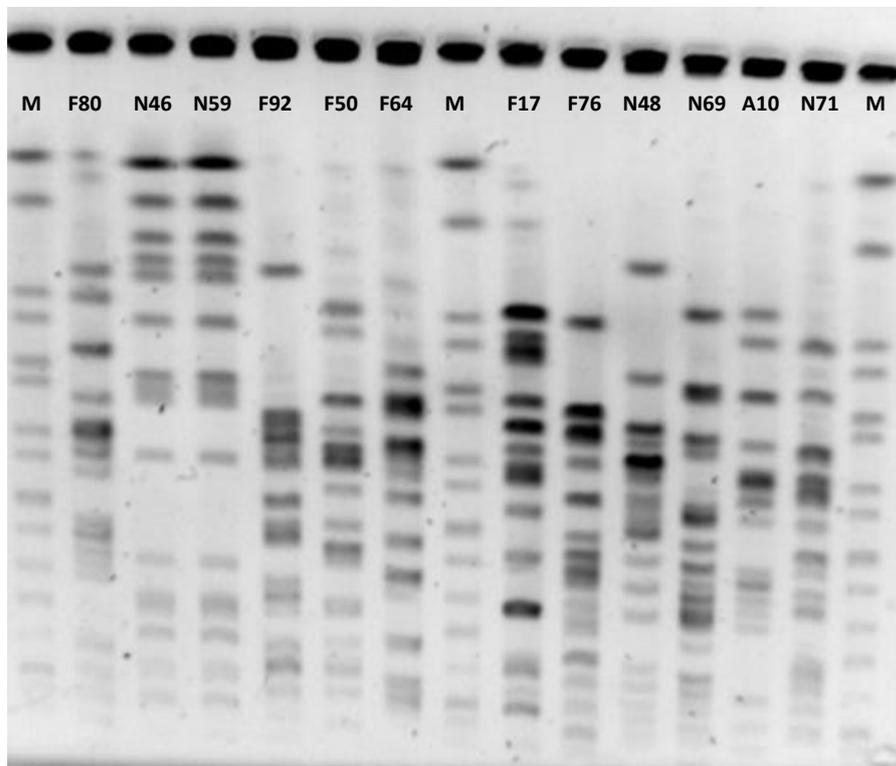


Figura 9: Padrão de bandas em gel de agarose obtido através da eletroforese de campo pulsante. M– marcador (*Salmonella entérica* subespécie *entérica* sorotipo Braenderup H9812).

A detecção de 28 pulsotipos (PT) diferentes do universo de 30 cepas de *E. coli* com uma baixa porcentagem de similaridade genética ($\leq 68\%$) indica que várias cepas com diferentes perfis de virulência estão circulando dentro da propriedade leiteira avaliada. Essa alta variabilidade de pulsotipos pode estar relacionada ao fato de que, o presente estudo não trabalhou com cepas de *E. coli* pertencentes a um grupo específico considerando a classificação em patotipos ou sorotipos, sendo que estas cepas apresentavam apenas em comum, as características gerais da espécie. *E. coli* é uma espécie conhecida por sua diversidade, considerando virulência, resistência e outros genes, frente a esse contexto, um estudo realizado por LEIMBACH et al. em 2017, concluiu que a variedade de fatores de virulência observada em cepas comensais encontrava-se de acordo com a alta diversidade de *E. coli* associada a bovinos.

No presente estudo, apesar da elevada variabilidade de pulsotipos, os dados, como a fonte de coleta e estação climática, contribuíram para o entendimento da diversidade genética (Figura 10).

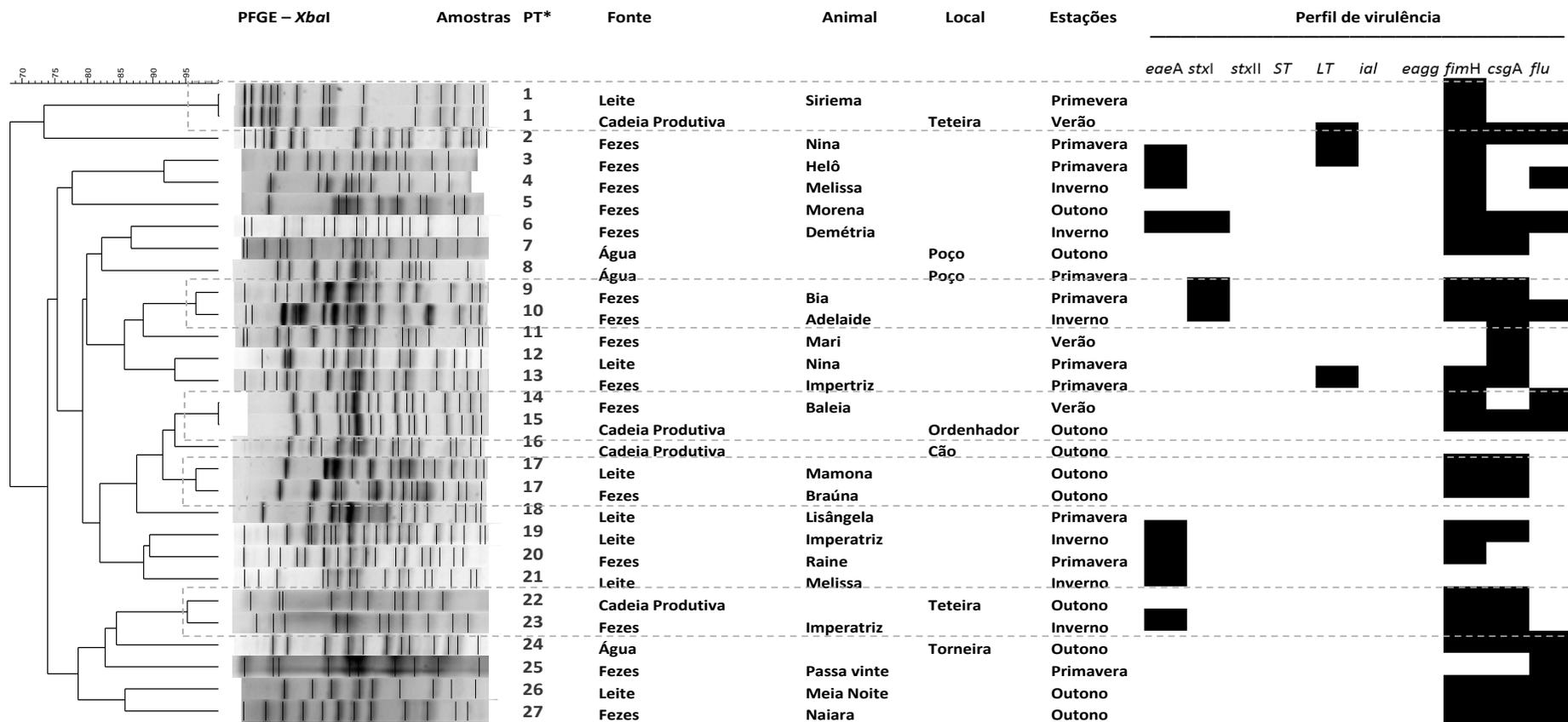


Figura 10: Dendrograma formado a partir de 30 cepas de *E. coli* eleitas a partir dos perfis de virulência gerados. A escala indica níveis de similaridade dentro deste conjunto de cepas com base na digestão de restrição enzimática *XbaI* do DNA bacteriano total. A coluna amostras mostra a designação das cepas; A coluna PT, representam os pulsotipos* gerados a partir do PFGE; A coluna fonte indica o ambiente de isolamento de bactérias; animais e local são os animais e locais pertencentes ao estudo; a coluna estações representa as estações climáticas* onde foram coletadas; as colunas subsequentes descrevem os resultados da reação em cadeia da polimerase para genes de virulência testados, com presença indicada em preto e ausência indicada em branco.

As cepas N46 e C59 apresentaram o mesmo pulsotipo (PT1) assim como as cepas N66 e F86, que apresentaram o pulsotipo 17. As cepas N46 e C59 foram encontrados respectivamente no leite e na teteira, em períodos diferentes (primavera e verão) e obtiveram o mesmo perfil de virulência (*fimH*⁺). Já as cepas do pulsotipo 17, foram isoladas de leite e fezes, na mesma estação (outono), ambos apresentaram o mesmo perfil de virulência caracterizado pela presença de *fimH*⁺ e *csgA*⁺ que também estão associados a formação de biofilme.

Quatro pulsotipos distintos PT9, PT10, PT14 e PT15, representados pelas cepas F64, F17, F76, C69 respectivamente mostraram similaridade genética de 97%, porém distribuíram-se em dois agrupamentos distintos. Ambas as cepas, F64 e F17, foram encontradas nas fezes, sendo de diferentes animais e presentes em diferentes estações, primavera e inverno, respectivamente. Além disso, apresentaram perfis de virulência relacionados ao biofilme. No entanto as duas cepas foram positivas para o gene *stxI* que está relacionado a produção de toxina shiga. Já as cepas F76 e C69 foram encontradas nas fezes e no ordenhador da propriedade, também em diferentes estações, verão e outono, e do mesmo modo compartilham genes de virulência relacionados a biofilme.

Dois pulsotipos, cujas cepas são C72 (PT 22), que esteve presente na teteira durante o outono e, F27 (PT23) encontrada nas fezes no período de inverno, mostraram-se com 95% de similaridade genética e apresentaram perfil de virulência semelhante em relação ao biofilme, todavia a cepa F27 também foi positiva para o gene de adesão *eaeA*. No presente estudo, 80% das cepas (8/10) com similaridade genética de 95% a 100% foram observadas em três estações diferentes: verão, primavera e outono, que correspondem aos períodos do ano mais quentes do Brasil. Apenas duas cepas (20%) foram observadas no inverno. A prevalência de *E. coli* O157:H7 no gado há muito vem sendo relacionada com a influência sazonal, onde obtém as maiores taxas de infecção nos meses mais quentes (HANCOCK et al., 1994). OLIVER & PAGE (2016) observaram interações significativas entre o tratamento ea estação ao avaliar os efeitos das variáveis climáticas sazonais na persistência de *E. coli* em fezes de gado através de diferentes tratamentos de exposição em campo aberto ou em ambiente com proteção de estufa tipo túnel. Em seu trabalho, a temporada teve impacto expressivo. A persistência de *E. coli* (P<0,001) em 2012, ambas as estações, verão e outono, obtiveram maiores contagens de *E. coli* quando comparadas à primavera e ao inverno para todos os tratamentos combinados. Já em 2013, as maiores contagens de *E. coli* (P<0,001) foram apresentadas apenas no verão e a primavera de 2013 correspondeu ao período em que, as contagens de *E. coli* foram consideravelmente maiores no final da experiência em relação ao dia 0 (P<0,001).

Além de estar presente em diferentes estações, esta espécie também foi encontrada em diferentes fontes, tais como leite, fezes e teteira e essas condições podem estar relacionadas a fatores que ajudam na persistência desse microrganismo no ambiente de produção de leite. *E. coli* é considerada de alta diversidade com cepas comensais e patogênicas, que podem colonizar e persistir em humanos, animais e até mesmo em ambientes abióticos (TENAILLONet al., 2010). Vale ressaltar que *E. coli* pode entrar em um ambiente de produção leiteira através de novos animais inseridos no rebanho; além do meio ambiental, como ar, água e solo; animais selvagens; ou materiais orgânicos, como alimentação de gado e cama e embora a dinâmica e as rotas de introdução, colonização, persistência nos animais e o ambiente da fazenda não sejam bem caracterizados, esses fatores de virulência são importantes devido à intensificação da doença no animal (LAMBERTINI et al., 2015).

5.4. Análise através da técnica MLST

As cepas de *E. coli* que apresentaram de 95% a 100% de similaridade genética (n=10) através do PFGE foram submetidas à técnica de MLST. A informação epidemiológica geral do tipo de sequência (ST) com base nos dados do MLST destas cepas revelou um total de 8 STs, onde todos foram combinados com o banco de dados do MLST de *E. coli*.

Duas cepas (F64 e C72, fezes e teteira, respectivamente) foram caracterizadas com o mesmo tipo de sequência, ST164, porém não apresentaram o mesmo pulsotipo. Já as cepas N66 e F86, provenientes de leite e fezes, respectivamente, apresentaram o mesmo tipo de sequência, o ST1308 e também o mesmo pulsotipo, PT17, sendo inicialmente consideradas como sendo cepas clones no ambiente monitorado (Figura 11).

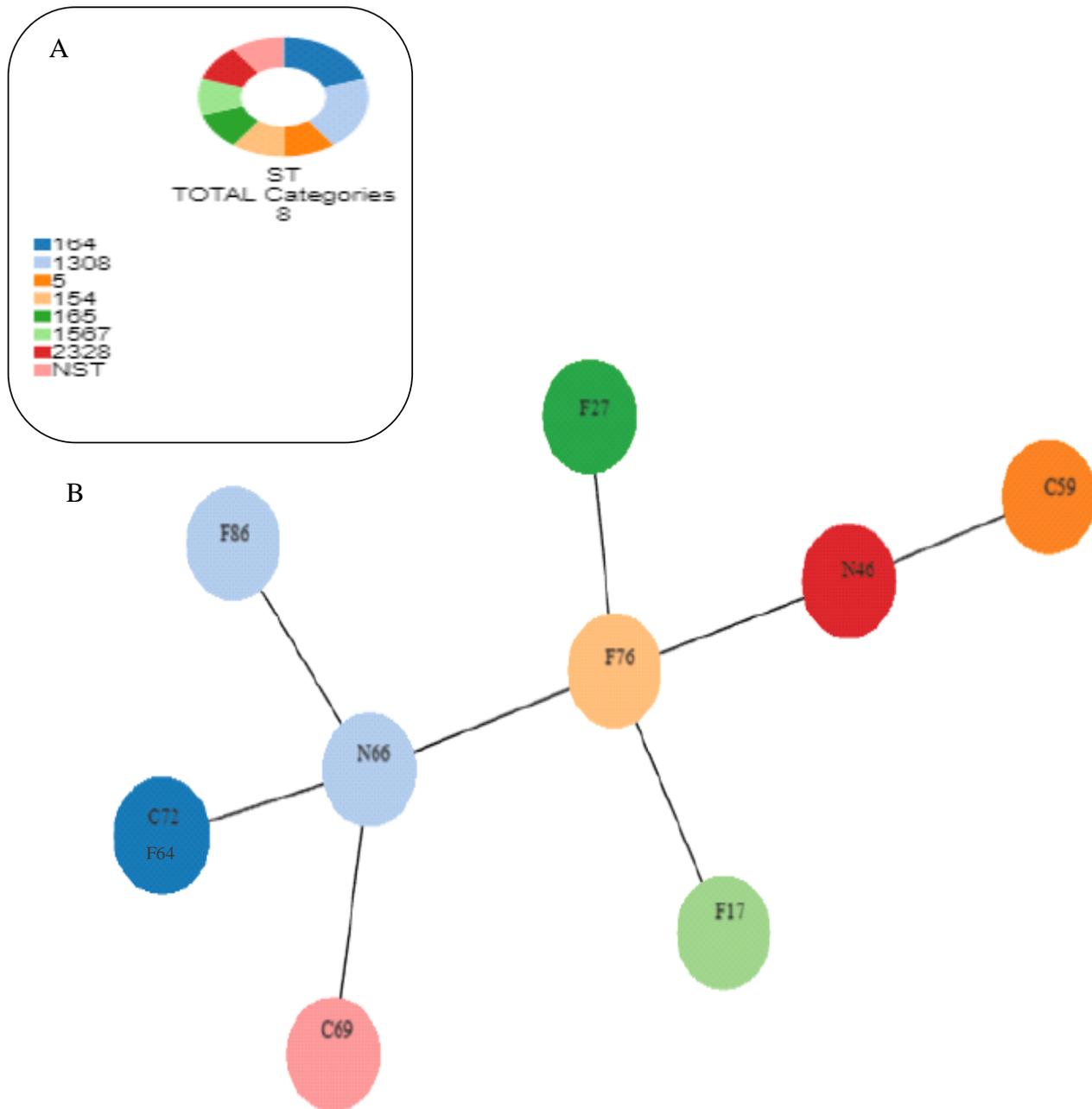


Figura 11: (A) Gráfico de torta representando os tipos de sequência entre as cepas *E. coli* avaliadas no estudo. (B) aplicação do algoritmo PHILOVIZ, mostrando a estrutura populacional, retratando a distribuição clonal das cepas de *E. coli*. Cada tipo de sequência é representado por um círculo, e dentro de cada círculo estão inseridos os nomes das cepas representantes. As cepas que apresentaram variação de um único *locus* foram demonstrados com uma única cor (azul claro) e as cepas que apresentaram combinações exatas foram representadas por um único círculo azul escuro.

Os grupos filogenéticos A e AxB1 (ume quatro STs, respectivamente) foram identificados entre as cepas estudadas (Tabela 4).

Tabela 4: Perfil alélico gerado através da técnica de MLST em cepas de *E. coli* de diferentes origens da cadeia produtiva do leite

Cepas	Fonte	Estação	PFGE	Perfil alélico							MLST		Filogrupo*
				<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST	CC	
N46	Leite	Primavera	100%	6	95	3	18	11	122	6	2328	-	-
C59	Teteira	Verão		6	95	4	88	7	7	10	5	13	AxB1
N66	Leite	Outono	100%	6	6	33	1	24	8	7	1308	-	-
F86	Fezes	Outono		6	6	64	1	24	8	7	1308	-	-
F64	Fezes	Primavera	97%	6	4	32	16	12	8	7	164	-	AxB1
F17	Fezes	Inverno		46	35	208	6	4	16	4	1567	-	-
F76	Fezes	Verão	97%	6	6	5	10	9	8	6	154	-	AxB1
C69	Ordenhador	Outono		13	14	19	36	23	11	7	NST	-	-
C72	Teteira	Outono	95%	6	4	32	16	12	8	7	164	-	AxB1
F27	Fezes	Inverno		10*	27*	5	10	12	8	2	165	165	A

NST – Novo ST foi encontrado para essa cepa. *Dados do filogrupo foram extraídos do banco de dados EnteroBase.

Apesar de terem sido reconhecidas por combinação exata, as cepas F64 e C72 que pertencem a pulsotipos distintos, foram encontradas em amostras e estações climáticas diferentes, corroborando com HOLDEN et al. 2004 que acredita que a habilidade das bactérias para evoluir em “saltos repentinos” pode dar um longo caminho para explicar por que a sistemática bacteriana permaneceu como uma confusão. Duas cepas muito intimamente relacionadas (no sentido de que compartilham um antepassado comum recente) podem exibir características fenotípicas divergentes. Além disso, cepas de *E. coli* ST164 foram enquadradas no grupo filogenético AxB1. A tipagem molecular através do MLST demonstrou uma frequente recombinação de cepas de diferentes grupos filogenéticos, ou seja, essas cepas adquiriram material genético de diferentes origens filogenéticas, resultando em cepas conhecidas como híbridas (AxB1 e ABD) (WIRTH et al., 2006). Essas raras cepas presumivelmente representam descendentes de uma subpopulação que divergiu no início da evolução de *E. coli*, antes da geração dos 4 grupos "filogenéticos" modernos A, B1, B2 e D (WIRTH et al., 2006; ACHTMAN & WAGNER, 2008). Segundo KIEFFER et al. (2017), a cepa *E. coli* ST164 é proveniente de amostras de animais, incluindo aves, suínos e bovinos, fortalecendo a probabilidade de origem animal para esse tipo de sequência. DENG et al. em 2015 encontraram este mesmo ST164 em uma cepa proveniente de suínos ao investigar sobre a prevalência de resistência a antimicrobianos e genes ESBL / pAmpC em cepas de *E. coli* de fazenda de vinhos no sul da China.

Recente busca no banco de dados EnteroBase (substituto em partes do site do MLST para *E. coli*), mostrou que 42 cepas com ST164 foram depositadas na coleção, sendo 11 relacionadas com bovino nos Estados Unidos (n=10) e Japão (n=1). No Brasil, foi observado somente uma cepa proveniente de diarreia em humanos isolada em São Paulo, no entanto, até o momento esses dados não foram descritos na literatura. Nenhuma cepa de *E. coli* ST164 relacionada a bovino no Brasil foi encontrada, sugerindo que o presente trabalho seja o primeiro relato de caso em bovinos no país (dados não publicados).

As cepas N66 e F86 caracterizadas como ST1308, apresentaram o mesmo pulsotipo, o PT17, que inicialmente foi considerado como sendo clone, contudo através da análise pela técnica de MLST foi detectado uma variação pontual em um único *locus* (*gyrB*). Essa variação pode ter sido encontrada em função da sequência de gene ser parcial, acarretando na busca por combinações (*match*) mais próximas e não exatas no PubMLST. Por isso, pode ser errôneo assumir o termo “clone”, uma vez que este é definido como cepas bacterianas com genótipos indistinguíveis. Porém o genoma do cromossoma (no qual estão inseridos os genes *housekeeping*) pode evoluir em taxas variáveis diferentes espécies. Por conseguinte, os agrupamentos de cepas que compartilham genótipos idênticos ou muito semelhantes, derivam de um único ancestral comum, e esses agrupamentos podem apresentar diversificação em diferentes escalas de tempo, de décadas para centenas de milhares de anos (TUNER & FEIL, 2007).

Embora exista essa variação alélica, a possibilidade de serem a mesma cepa ainda não pode ser descartada, porém para este caso, seria necessário um método de tipagem molecular mais robusto para que se comprove essa relação clonal como o sequenciamento total do genoma (WGS), a qual é uma ferramenta poderosa e altamente atraente para investigações epidemiológicas e dinâmicas populacionais, a qual permite uma comparação direta com os resultados obtidos por métodos convencionais de tipagem como por exemplo, PFGE e MLST (MELLMANN et al., 2011; GRAD et al., 2012; SABAT et al., 2013).

Em 2010, GEUE et al. encontraram esse mesmo ST1308 ao estudar a genotipagem molecular em cepas de *E. coli* do sorogrupo O156 provenientes de bovino na Alemanha. No banco de dados Enterobases é possível observar sete cepas oriundas de bovino depositadas na base, distribuídas em países como Japão, Alemanha e Estados Unidos. Nenhuma cepa encontrada no Brasil foi depositada até o momento e novamente sugere que este trabalho seja o primeiro relato de caso (dados não publicados). As demais cepas foram identificadas como pertencentes ao ST5, ST154, ST2328, ST1567 e ST165. *E. coli* ST5 também está classificada

como filogrupo AxB1 e pertence ao CC13, somente duas cepas ST5 provenientes de humanos foram depositadas no banco de dados Enterobases. RAJKHOWA et al. (2010) ao analisar *E. coli* O157 isolados de pacientes com síndrome hemolítico-urêmica, diarreia e pacientes assintomáticos nos Estados Unidos também observaram a presença de apenas uma cepa com o mesmo ST.

Cepas de *E. coli* ST165 são classificadas dentro do grupo filogenético A, onde predominam as cepas comensais desse agente (CLERMONT et al., 2000; SABATÉ et al., 2006). Porém, um estudo realizado por SUOJALA et al., 2011 mostrou que a maioria das *E. coli* isoladas de vacas leiteiras com mastite pertenciam ao filogrupo A. Vários outros relatos indicaram que *E. coli*, de origem bovina patogênica e não patogênica, tem sido atribuída principalmente aos grupos filogenéticos A e B1 que são considerados comensais (SILVA et al., 2009; SON et al., 2009; SHELDON et al., 2010; HENRIQUES et al., 2014). De acordo com a base de dados MLST de *E. coli*, ST165 parecem ser tipo comum em cepas de origens humanas e animais.

O ST5 pertencente a um complexo clonal (CC) 13 e o ST165 ao CC165. Os complexos clonais são definidos como um grupo de genótipos multilocus em que cada genótipo compartilha pelo menos cinco loci em comum com pelo menos um outro membro do grupo (FEIL et al., 2001). Muitos estudos têm sido atribuídos ao CC165 em si, abrangendo outros STs pertencentes a este complexo clonal, sendo poucas as informações diretamente relacionadas a cepa de *E. coli* ST165 (SHEPARD et al., 2012; RAMOS et al., 2013; CHATTAWAY et al., 2017; YU et al., 2018). EICHHORN et al. (2015) também encontraram apenas uma cepa de *E. coli* (O11: K58) tipada como ST165 (neste caso em coelhos selvagens com enterite) ao levantar a hipótese de que os sorotipos EHEC, não-O157 altamente virulentos, refletem linhagens filogenéticas semelhantes, fornecendo assim novas orientações sobre a evolução desse patótipo. Novamente nenhum relato sobre ST5 e ST165 foi encontrado no Brasil.

Não foi possível atribuir à cepa C69 um tipo de sequência, embora a sequência de gene seja exata, nenhum ST foi encontrado ao realizar a busca por combinações exatas. No entanto, ao buscar por combinações mais próximas, pode-se observar que esta cepa variava em apenas um dos sete loci (*recA*) de seis STs (127, 3207, 3451, 5417, 5806 e 6650) diferentes, onde nenhuma era pertencente a um complexo clonal. Frente a esse contexto, essa cepa deverá ser depositada na base do banco de dados do MLST para que possa gerar um novo ST (NST). Para isso, as sequências dessa cepa deverão ser verificadas cuidadosamente em relação a diferenciação alélica, sendo submetidas ao sequenciamento de nova geração como proposto

pelo MLST e posteriormente enviada ao curador do esquema MLST, para que seja atribuído um novo número de alelo para a nova sequência, no qual será então inserida no banco de dados (AANENSEN & SPRATT, 2005). Curiosamente essa foi a única cepa oriunda de humano, das dez cepas sequenciadas para a técnica MLST.

5.5. Análise dos perfis genéticos gerados pelas diferentes técnicas de tipagem molecular

Ambas as técnicas, PFGE e MLST têm sido frequentemente utilizadas em estudos com *E. coli* provenientes de bovino.

Embora as cepas N46 e C59 terem apresentado o mesmo pulsotipo, PT1, ambas não compartilharam o mesmo ST (ST2328 e ST5, respectivamente). Já as cepas N66 e F86 (P17), esse resultado se apresentou de maneira diferente, onde ambas compartilharam o mesmo ST1308. Além disso, de acordo com o MLST as duas cepas F64 (PT9) e C72 (PT22) que também apresentaramo mesmo ST164.

Enquanto o PFGE nos revelou o alto grau de diversidade e nos direcionou para os estudos sobre essas cepas no ambiente de produção leiteira, os dados do MLST traçaram uma dinâmica sobre a origem das nossas cepas, o que levou ao entendimento de que essas são cepas comensais e que de alguma forma estão carreando genes de virulência. O que corrobora com o fato dessa técnica permitir detectar alterações genômicas que ocorrem com maior frequência.

A premissa é que fatores de virulência podem estar presentes em cepas comensais, sendo considerados fatores *fitness* (FFs), que auxiliam na colonização inicial, permitindo a sobrevivência do microrganismo no intestino, podendo então estabelecer de uma infecção. A colonização gastrointestinal, a persistência e a capacidade de causar doenças extraintestinais acometidas por esses FFs são como consequências do comensalismo bacteriano com a função primária para melhorar a aptidão no trato gastrointestinal bovino (LE GALL et al., 2007; TENAILLON et al., 2010; LEIMBACH et al., 2013)

A flexibilidade genômica de *E. coli* resulta num vasto estilo de vida e fenótipos desse microrganismo, onde um pouco mais da metade (60%) de cada genoma é compartilhado por todas as cepas, sendo conhecido como genoma do núcleo, o restante do genoma (40%) é altamente variável em cepas individuais, chamado de genoma flexível, no qual estão presentes os genes responsáveis pelas adaptações específicas do habitat ou condições ambientais sendo essa a base para a diversidade fenotípica de *E. coli*, pois consiste principalmente em elementos genéticos móveis (EGMs), incluindo plasmídeos, ilhas genômicas (IGs) e fagos, que facilitam a transferência horizontal de genes e são as forças motrizes para a diversidade microbiana,

evolução e potencial de adaptação (TOUCHON et al., 2009; KAAS et al., 2012; LEIMBACH et al 2013).

Além disso, uma estrutura filogenética diversificada de cepas provenientes de bovinos pode dar-se em decorrência da forte pressão de seleção exercida por uso de antimicrobianos e agentes sanitizantes, além de uma ampla gama de outras espécies bacterianas que competem entre si constantemente induzindo a elaboração de estratégias de sobrevivência e adaptação ao hospedeiro (SOARES, 2017).

LEIMBACH et al. (2017) investigaram os genomas de *E. coli* em relação à mastite bovina e puderam observar diferenças no conteúdo genético entre cepas de *E. coli* associadas a mastite (MAEC) e cepas comensais em relação à diversidade filogenética e genômica de *E. coli* bovina em geral. Os autores notaram que as cepas bovinas são filogeneticamente diversas e não mostram um conteúdo de genes relacionados à virulência que está associado com qualquer patótipo. *E. coli* mamária patogênica (MPEC) tem sido proposta como um patótipo de *E. coli* associado a infecções intramamárias. Embora os genes de virulência vinculados a essas infecções tenham sido associados diretamente com os patótipos intestinais de *E. coli* (por exemplo, toxina shiga, receptor de intimina translocada, etc.), por outro lado, ainda não está clara a questão da virulência da glândula mamária quando em lactação apesar de muitos anos de investigação, levando ao entendimento que as características que definem esse grupo ainda não estão totalmente elucidadas. (WENZ et al., 2006; BLUM et al., 2008).

Métodos moleculares têm apresentado grande capacidade para caracterizar as bactérias com base na sua variação genética natural, que pode ocorrer devido a mutação ou transferência horizontais de gene. Dois ramos da epidemiologia molecular podem ser distinguidos através dos métodos moleculares: classificação e tipagem. A classificação mostra as relações evolutivas e as espécies de grupos em grupos ou complexos clonais (onde ocorre variações alélicas entre as cepas), nesse caso, técnicas como MLST e MLEE (*Multilocus enzyme electrophoresis*) são mais proeminentes para a classificação molecular, enquanto isso a tipagem é usada com mais frequência para a diferenciação de isolados clínicos ou ambientais. Os métodos de PFGE ou aqueles baseados em PCR, tais como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ou caracterização de genes de virulência, têm sido usados para essa abordagem. A epidemiologia a longo prazo pode exigir classificação, enquanto que a epidemiologia local de curto prazo é frequentemente realizada por métodos de tipagem de alta resolução (MAIDEN et al., 1998; ACHTMAN & WAGNER, 2008).

Assim como SOARES 2017, nós podemos concluir que a combinação de técnicas de tipagem utilizada para avaliar parâmetros da relação clonal entre cepas de *E. coli* vai depender do tipo de estudo epidemiológico pretendido.

6. CONCLUSÃO

Foi possível detectar a presença de genes associados à virulência, sendo em maior escala os genes relacionados à produção de biofilme com a prevalência do *fimH* e *csgA*, respectivamente.

A análise da diversidade pela técnica de PFGE permitiu observar uma elevada variabilidade genética, no qual associou-se com o critério de seleção das cepas estudadas.

Foram detectados oitotipos diferentes de STs, sendo prevalente o ST164, no qual mostrou uma relação clonal entre duas cepas avaliadas e o ST1308 também apresentou uma relação clonal entre duas cepas, porém com uma variação alélica pontual (*gyrB*), fazendo-se necessária a utilização de novas metodologias que comprove essa questão.

Não foram encontrados dados na literatura sobre os STs (ST5, ST164, ST165, ST1308) obtidos no presente estudo no Brasil originados de cepas de *Escherichia coli* bovinas, sugerindo esse trabalho como o primeiro relato no país. Além disso, um novo ST foi encontrado, porém para que o mesmo seja enviado ao curador do esquema MLST para que possa ser inserido no banco de dados do programa deverá ser submetido anteriormente ao sequenciamento de nova geração.

A presença dessas cepas em diferentes locais, bem como em sua grande maioria, nas estações que corresponde aos períodos mais quentes no Brasil, confirma a premissa que esses microrganismos têm promovido mecanismos como de virulência que os capacitam para a adaptação fora do hospedeiro e os mantem persistindo no ambiente por tempo prolongado.

Por fim, o presente estudo foi capaz de demonstrar que embora nenhuma cepa patogênica esteja se espalhando, a permanência desse microrganismo por mais de um ano dentro do ambiente estudado carregando gene de virulência, indica que essas cepas podem estar em constante alteração metabólica para se manter viável e em algum momento podem promover casos de mastite dependendo da estabilidade do animal. Além de apresentar um potencial risco de transmissão até mesmo para humanos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANENSEN, D. M. & SPRATT, B. G. The multilocus sequence typing network: mlst.net. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. W728–W733, 2005.

ACHTMAN, M. & WAGNER, M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 431–440, 2008.

ADICPTANINGRUM, A.M.; BLOMFIELD, I.C.; TANS, S.J. Direct observation of type 1 fimbrial switching. **EMBO Reports**, v. 10, p. 527–532, 2009.

ADKINS, P. R.; MIDDLETON, J. R.; FOX, L. K. Comparison of Virulence Gene Identification, Ribosomal Spacer PCR, and Pulsed Field Gel Electrophoresis for Strain-Typing *Staphylococcus aureus* Isolated from Cases of Subclinical Bovine Mastitis in the USA. **Journal of Clinical Microbiology**, JCM-03282, 2016.

AHMED, W. F & SAMER, A. Detection of Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli* in Raw and Pasteurized Milk. **Zagazig Veterinary Journal**, v. 45, n. 1, p. 47-54, 2017.

ALMEIDA, D. Manuseamento de produtos hortifrutícolas. SPI – **Sociedade Portuguesa de Inovação**. Portugal, 2005.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ALTWEGG, M. & BOCKMUHL, J. *Escherichia coli* e *Shigella*. In: Topley & Wilson Microbiology and microbial infections. **Microbiology and Microbial Infection**, 9th ed., London: Arnold, 1998.

ANDERSON, G. G.; PALERMO, J. J.; SCHILLING, J. D.; ROTH, R.; HEUSER, J.; HULTGREN, S. J. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. **Science**, v. 301, p. 105–107, 2003.

ANDREI, A. & ZERVOS, M. J. The application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.5, n.130, p.662-668, 2006.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 1751-1773, 2010.

AWALE, M.; DUDHATRA, G. B.; KUMAR, A.; CHAUHAN, B. N.; KAMANI, D. R.; MODI, C. M.; PATEL, H. B.; MODY, S. K. Bovine mastitis: a threat to Economy. **Scientific Reports**, v. 1, n. 5, p. 1-10, 2012.

BARNHART, M.M. & CHAPMAN, M. Curli Biogenesis and Function. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 131-147, 2007.

BEAN, A.; WILLIAMSON, J.; CURSONS, R. T. Virulence Genes of *Escherichia coli* Strains Isolated from Mastitic Milk. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, n. 6, p. 285-287, 2004.

BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J.M. *Escherichia coli* biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 249–289, 2008.

BERCHIERI JUNIOR, A. & MACARI, M. Doenças das aves. Campinas: **FACTA**, p. 455-469. 2009.

BERRO, R.; BRANDÃO, J. B.; BREITENBACH, R. Sistema local de produção de leite em Itaqui, Rio Grande do Sul: caracterização e diferenciação dos estabelecimentos formais. **7º Encontro de Economia Gaúcha – FEE**, Porto Alegre, 2014. Disponível em <<http://www.fee.rs.gov.br/wp-content/uploads/2014/05/201405237eeg-mesa5-producaoileiteitaqui.pdf>>. Acesso em 21 de Julho de 2017.

BERTSCHINGER, H. U. & FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli* infections. In: STRAW, B.E. Diseases of swine, 5th ed., **Iowa State University Press**, Ames, IA. p. 431-468, 1999.

BETTELHEIM, K. A. KUZEVSKI, A.; GILBERT, R.A.; KRAUSE, D. O.; MCSWEENEY, C. S. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 699-709, 2005.

BHOMKAR, P.; MATERI, W.; SEMENCHENKO, V.; WISHART, D. S. Transcriptional response of *E. coli* upon FimH-mediated fimbrial adhesion. **Gene Regulation and Systems Biology**, v. 4, p. 1–17, 2010.

BIBBAL, D.; LOUKIADIS, E.; KÉROURÉDAN, M.; PEYTAVIN DE GARAM, C.; FERRÉ, F.; CARTIER, F.; GAY, E.; OSWALD, E.; AUVRAY, F.; BRUGÈRE, H. Intimin Gene (*eae*) Subtype-Based Real-Time PCR Strategy for Specific Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 in Cattle Feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 1177–1184, 2014.

BOGNI, C.; ODIERNO, L.; RASPANTI, C.; GIRAUDO, J.; LARRIESTRA, A.; REINOSO, E.; LASAGNO, M.; FERRARI, M.; DUCRÓS, E.; FRIGERIO, C.; BETTERA, S.; PELLEGRINO, M.; FROLA, I.; DIESER, S.; VISSIO, C. ‘War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens’, In: MÉNDEZ-VILAS, A. (ed.), Science against microbial pathogens: **Communicating current research and technological advances**, p. 483-494, 2011.

BONACORSI, S. P.P.; CLERMONT, O.; TINSLEY, C.; LE GALL, I.; BEAUDOIN, J. C.; ELION, J.; NASSIF, X.; BINGEN, E. Identification of Regions of the *Escherichia coli* Chromosome Specific for Neonatal Meningitis-Associated Strains. **Infection and Immunity**, p. 2096–2101, 2000.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G. I.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, p. 1453-1461, 1997.

BLUM, S. E.; HELLER, E. D.; LEITNER, G. Long term effects of *Escherichia coli* mastitis. **The Veterinary Journal**, v. 201, p. 72-77, 2014.

BLUM, S.; HELLER, E. D.; KRIFUCKS, O.; SELA, S.; HAMMER-MUNTZ, O.; LEITNER, G. Identification of a bovine mastitis *Escherichia coli* subset. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 1–2, p. 135–48, 2008.

BRANGER, C.; ZAMFIR, O.; GEOFFROY, S, LAURANS, G.; ARLET, G.; THIEN, H. V.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; DENAMUR, E. Genetic background of *Escherichia coli* and extended spectrum beta-lactamase type. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 54-61, 2005.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa N°62. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, 2011.

BUCHANAN, R.L. & DOYLE, M.P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. **Food Technology**, v. 51, p. 69-76, 1997.

BURVENICH, C.; BANNERMAN, D. D.; LIPPOLIS, J. D.; PEELMAN, L.; NONNECKE, B. J.; KEHRLI, M. E., JR.; PAAPE, M. J. Cumulative physiological 50 events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. **Journal Dairy Science**, v. 90, p. E39-54, 2007.

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

BUYUKCANGAZ, E.; VELASCO, V.; SHERWOOD, J.S.; STEPAN, R.M.; KOSLOFSKY, R.J.; LOGUE, C.M. Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) Isolated from Animals and Retail Meat in North Dakota, United States. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 7, p. 608-617, 2013.

CAMPOS, L.C. & TRABULSI, L.R. *Escherichia*. In.: TRABULSI, L.R. et al. Microbiologia. 3 ed. São Paulo: **Atheneu**, p. 215-228, 2002.

CHATTAWAY, M.A.; DAY, M.; MTWALE, J.; WHITE, E.; ROGERS, J.; DAY, M.; POWELL, D.; AHMAD, M.; HARRIS, R.; TALUKDER, K. A.; WAIN, J.; JENKINS, C.; CRAVIOTO, A. Clonality, virulence and antimicrobial resistance of enteroaggregative *Escherichia coli* from Mirzapur, Bangladesh. **Journal of Medical Microbiology**, 2017 (aceito para publicação)

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex In Vitro Amplification of Virulence-Associated Genes. **Applied and Environment Microbiology**, v. 62, p. 3462–3465, 1996.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, M. L.; BARRET, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-ative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22 n. 6 p. 996-1006, 1985.

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

COBBOLD, R. & DESMARCHELIER, P. A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 71, n. 1-2, p. 125-137, 2002.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Conjuntura mensal especial, 2017. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_15_14_13_38_leite_abril_2017.pdf. Acesso em 20 de Janeiro de 2018

COOPER, J. E. & FEIL, E. J. Multilocus sequence typing--what is resolved? **Trends Microbiology**, v. 12, p. 373-377, 2004.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407. 2012.

CROXEN, M. A. & FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, J. R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2888-2896, 2001.

DALTON, K.; ISRAELSEN, C.; YOUNG, A. J. The importance of increasing milk quality by 91 decreasing the Somatic Cell Count (SCC). **Agriculture Extension Utah State University**, 2017.

DANESE, P.N.; PRATT, L.A.; DOVE, S.L.; KOLTER, R. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 37, p. 424-432, 2000.

DERAL- Departamento de Economia Rural da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do estado do Paraná. **Análise da Conjuntura Agropecuária**, online, 2014.

DESMARAI, T. R.; SOLO-GABRIELE, H. M.; PALMER, C. J. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1165-1172, 2002.

DEURENBERG, R.; VLAYEN, J.; GUILLO, S.; OLIVER, T. K.; FERVERS, B.; BURGERS, J. Standardization of search methods for guideline development: an international survey of evidence-based guideline development groups. **Health Information & Libraries Journal**, v. 25, n. 1, p. 23-30, 2008.

DIECKMANN, R., HELMUTH, R., ERHARD, M. AND MALORNY, B. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-

assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p. 7767-7778, 2008.

DINGLE, K. E.; COLLES, F. M.; WAREING, D. R.; URE, R.; FOX, A. J.; BOLTON, F. E.; BOOTSMA, H. J.; WILLEMS, R. J.; URWIN, R.; MAIDEN, M. C. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 14–23, 2001.

DOMKA, J.; LEE, J.; BANSAL, T.; WOOD, T. K. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 332-46, 2007.

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

DRASAR, B. S. & HILL, M. J. Human intestinal flora. London: **Academic Press, Ltd**, p. 38-43, 1974.

DYER, J. G.; SRIRANGANATHAN, N.; NICKERSON, S. C.; ELVINGER, F. Curli production and genetic relationships among *Escherichia coli* from cases of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 193-201, 2007.

EICHHORN, I.; HEIDEMANN, K.; SEMMLER, T.; KINNEMANN, B.; MELLMANN, A.; HARMSSEN, D.; ANJUM, M. F.; SCHMIDT, H.; FRUTH, A.; VALENTIN-WEIGAND, P.; HEESEMANN, J.; SUERBAUM, S.; KARCH, H.; WIELER, L. H. Highly virulent non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes reflect similar phylogenetic lineages, providing new insights into the evolution of EHEC. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 7041–7047, 2015.

EJRNAES, K. Bacterial Characteristics of Importance for Recurrent Urinary Tract Infections Caused by *Escherichia coli*. **Danish Medical Bulletin**, v. 58, p. B4187, 2011.

EMATER-RIO, **Relatório de atividades** 2015, 2016.

ENRIGHT, M. C.; DAY, N. P.; DAVIES, C. E.; PEACOCK, S. J.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p.1008-1015, 2000.

EWING, W.H. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4ed. New York. **Elsevier Publishing CO**, p. 536, 1986.

FAGUNDES, H.; POMPEU, L. B.; CORASSIN, C. H.; DE OLIVEIRA, C. A. F. Microbiological analysis and somatic cell counts in raw milk from farms of São Paulo State, Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 21, p. 3542-3545, 2011.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Dairy Production and Products – Milk Production. Disponível em <<http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.V3AZwbgrLIV>> Acesso em 05 ago. 2017.

FARROKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F.; GLASS, K.; OPPEGAARD, H.; RAYNAUD, S.; THEVENOT, D.; CONDRON, R.; DE REU, K.; GOVARIS, A.; HEGGUM, K.; HEYNDRICKX, M.; HUMMERJOHANN, J.; LINDSAY, D.; MISZCZYCHA, S.; MOUSSIEGT, S.; VERSTRAETE, K.; CERF, O. Review of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 190-2012, 2013.

FEIL, E. J.; HOLMES, E. C.; BESSEN, D. E.; CHAN, M. S.; DAY, N. P.; ENRIGHT, M. C.; GOLDSTEIN, R.; HOOD, D. W.; KALIA, A.; MOORE, C. E.; ZHOU, J.; SPRATT, B. G. Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: Short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 182–187, 2001.

FERNANDES, J. B. C.; ZANARDO, L. G.; GALVÃO, N. N.; CARVALHO, I. A.; NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. S. *Escherichia coli* from clinical mastitis: serotypes and virulence factors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 6, p. 1146–1152, 2011.

FERREIRA, A. J. P. & KNÖBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N., Di FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Ed.). Doença das aves. 2th ed. Campinas: **FACTA**, cap. 4.2, p. 457-471, 2009.

FITRHENRY, R. J.; REECE, S.; TRABULSI, L. R.; HEUSCHKEL, R.; MURCH, S.; THOMSON, M.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D. Tissue tropism of enteropathogenic *Escherichia coli* strains belonging to the O55 serogroup. **Infection and Immunity**. v.70, n.8, p.4362-4368, 2002.

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 7945-7, 2007.

FOXMAN, B.; ZHANG, L.; KOOPMAN, J.S.; MANNING, S. D.; MARRS, C. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. **Epidemiologic Perspectives & Innovations**, n. 2, p. 01-08, 2005.

FRANCISCO A. P.; VAZ, C.; MONTEIRO P. T.; MELO-CRISTINO, J.; RAMIREZ, M.; CARRIÇO, J. A. PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 87, 2012.

FRANCO, R. M. *Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana. 144 f. Tese de Doutorado, **Universidade Federal Fluminense**, 2002.

FRIEDRICH, A. W.; BIELASZEWSKA, M.; ZHANG, W.L.; PULZ, M.; KUCZIUS, T.; AMMON, A.; KARCH, H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 1, p. 74-84, 2002.

FUQUAY, J. W. Encyclopedia of Dairy Sciences. Boston, MA: **Elsevier**, 2011.

- GARCH, F. E.; SAUGET, M.; HOCQUET, D.; LECHAUDEE, D.; WOEHRLE, F.; BERTRAND, X. *mcr-1* is borne by highly diverse *Escherichia coli* isolates since 2004 in food producing animals in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, p. 51e1-51e4, 2017.
- GAUTAM, R.; BANI-YAGHOUB, M.; NEILL, W.H.; DÖPFER, D.; KASPAR, C.; IVANEK, R. Modeling the effect of seasonal variation in ambient temperature on the transmission dynamics of a pathogen with a free-living stage: Example of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 1, p. 10-21, 2011.
- GEUE, L.; SCHARES, S.; MINTEL, B.; CONRATHS, F. J.; MULLER, E.; EHRICHT, R.. Rapid Microarray-Based Genotyping of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Serotype O156:H25/H₇/Hnt Isolates from Cattle and Clonal Relationship Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 16, p. 5510–5519, 2010.
- GHIGO, J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. **Nature**, v. 412, p. 442–445, 2001.
- GOERING, R. V. Pulsed-field gel electrophoresis. In: PERSING, D. H. (Ed.). *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. **ASM Press**, p.185-196, 2004.
- GOLI, M.; EZZATPANAH, H.; GHAVAMI, M.; CHAMANI, M.; DOOSTI, A. Prevalence assessment of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* by multiplex polymerase chain reaction (M-PCR) in bovine sub-clinical mastitis and their effect on somatic cell count (SCC) in Iranian dairy cows. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 12, p. 3005–3010, 2012.
- GOPHNA, U.; OELSCHLAEGER, T. A.; HACKER, J.; RON, E. Z. Role of fibronectin in curli-mediated internalization. **FEMS Microbiology Letter**, v. 212, p. 55–58, 2002.
- GORDON, D. M.; CLERMONT, O.; TOLLEY, H.; DENAMUR, E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2484–2496, 2008.
- GORDON, D. M.; STERN, S. E.; COLLIGNON, P. J. Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. **Microbiology**, v. 151, p. 15–23, 2005.
- GRAD, Y. H.; LIPSITCH, M.; FELDGARDEN, M.; ARACHCHI, H. M.; CERQUEIRA, G. C.; FITZGERALD, M.; et al. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 109, n. 8, p. 3065-70, 2012.
- GROHN, Y. T.; WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; HERTL, J. A.; SCHULTE, H.; BENNETT, G.; SCHUKKEN, Y. H. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3358–3374, 2004.
- GYLES C. L. & FAIRBROTHER J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. A.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. (Eds). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. **Wiley-Blackwell**, p. 231-265, 2010.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. E45–E62, 2007.

GYLES, C. L & FAIRBROTHER J. M. In: GYLES C. L et al. *Escherichia coli* In: Pathogenesis of bacterial infections in animals, 3ed. Ames, Iowa: **Iowa State University Press**, p. 193-214, 2004.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E.; KINSEL, M. L.; TARR, P. I.; RICE, D. H.; PAROS, M. G. The prevalence of *Escherichia coli* Persistence of *E. coli* O157:H7 on dairy farms 259 O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. **Epidemiology & Infection**, v. 113, p. 199-207, 1994.

HANNAGE, P.; FEIL, E. J.; BRUEGGEMANN, A. B.; SPRATT, B. G. Multilocus Sequence Typing: Strain Characterization, Population Biology, and Patterns of Evolution Descent. In: PERSING, D. H. (Ed.). *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Washington: **ASM Press**, p. 235-243, 2004.

HARBOTTLE, H.; WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; ZHAO, S. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype *Newport* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2449-2457, 2006.

HAUSNER, M. & WUERTZ, S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3710–3713, 1999.

HENDERSON, I. R. & NATARO, J. P. Virulence functions of autotransporter proteins. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 1231-1243, 2001.

HENDERSON, I. R.; CAPELLO, R.; NATARO, J. P. Autotransporter proteins, evolution and refining protein secretion. **Trends Microbiology**, v. 8, p. 529-532, 2000.

HENRIQUES, S.; SILVA, E.; LEMSADDEK, A.; LOPES-DA-COSTA, L.; MATEUS, L. Genotypic and phenotypic comparison of *Escherichia coli* from uterine infections with different outcomes: Clinical metritis in the cow and pyometra in the bitch. **Veterinary Microbiology**, v. 170, p. 109–116, 2014.

HERNANDES, R. T.; VELSKO, I.; SAMPAIO, S. C.; ELIAS, W. P.; ROBINS-BROWNE, R. M.; GOMES, T. A.; GIRÓN, J. A. Fimbrial Adhesins Produced by Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 8391-8399, 2011.

HERRERA-LUNA, C.; KLEIN, D.; LAPAN, G.; REVILLA-FERNANDEZ, S.; HASCHEK, B.; SOMMERFELD-STUR, I.; MOESTL, K.; BAUMGARTNER, W. Characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents. **Veterinary Medicine**, v. 54, p. 1–11, 2009.

- JAMESDANIEL, S.; SALVI, R.; COLING, D. Auditory proteomics: methods, accomplishments and challenges. **Brain research**, v. 1277, p. 24-36, 2009.
- Jl, R.; LI, Y. J.; WANG, Y.; CUI, S. H.; JIANG, T. Comparison of multilocus sequence typing system and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Salmonella enteritidis*. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 27, p. 1065-1068, 2006.
- JOHNSON, J. R.; DELAVAR, I. P.; KUSKOWSKI, M.; STELL, A. L. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 78-88, 2001
- JOHNSON, J. R. & STELL, A. L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. **Journal of Infectious Diseases**, v.72, p. 181-261, 2000.
- JOLLEY, K. A.; CHAN, M. S.; MAIDEN, M. C.J. mlstdbNet – distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. **BMC Bioinformatics**, v. 5, p. 86, 2004.
- KAAS, R. S.; FRIIS, C.; USSERY, D. W.; AARESTRUP, F. M. Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. **BMC Genomics**, v. 13, p. 577, 2012.
- KANE, D. J.; SARAFIAN, T. A.; ANTON, R.; HAHN, H.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S.; BREDESEN, D. E. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science**, v. 262, n. 5137, p. 1274-1277, 1998.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 123-138, 2004.
- KASAI, H.; WATANABE, K.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; ISONO, K.; YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. Construction of the *gyrB* database for the identification and classification of bacteria. **Genome Informatics. Workshop Genome Informatic**, v. 9, p. 13–21, 1998.
- KAU, A. L.; HUNSTAD, D. A.; HULTGREN, S. J. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 54-59, 2005.
- KIEFFER, N.; POIREL, L.; CLERC, O.; LIENHARD, R.; NORDMANN, P. Co-production of MCR-1 and extended-spectrum β -lactamase in *Escherichia coli* recovered from urinary tract infections in Switzerland. **Infection**, p. 1-2, 2017.
- KJARGAARD, K.; SCHEMBRI, M. A.; RAMOS, C.; MOLIN, S.; KLEMM, P. Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 2, p. 695–702, 2000a.
- KLINE, K. A.; KAU, A. L.; CHEN, S. L.; LIM, A.; PINKNER, J. S.; ROSCH, J.; NALLAPAREDDY, S. R.; MURRAY, B. E.; HENRIQUES-NORMARK, B.; BEATTY, W., Mechanism for sortase localization and the role of sortase localization in efficient pilus assembly in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3237-3247, 2009.

KONEMAN, W. E.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, JR. W. C. As Enterobacteriaceae. In: KONEMAN, E. W. Diagnóstico microbiológico– texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: **Editora Médica e Científica**, p. 263-329, 2012.

KOREA, C. G.; GHIGO, J. M.; BELOIN, C. The sweet connection: solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*: multiple *E. coli* fimbriae form a versatile arsenal of sugar-binding lectins potentially involved in surface-colonisation and tissue tropism. **Bioessays**, v. 33, p. 300–311, 2011.

KOTETISHVILI, M.; STINE, O. C.; CHEN, Y.; KREGER, A.; SULAKVELIDZE, A.; SOZHAMANNAN, S.; MORRIS JR, J. G. Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2191–2196, 2003.

KOTETISHVILI, M.; STINE, O. C.; KREGER, A.; MORRIS JR, J. G.; SULAKVELIDZE, A. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1626–1635, 2002.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150–163, 2004.

LAGO, A.; GODDEN, S. M.; BEY, R.; RUEGG, P. L.; LESLIE, K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk with holding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 4441–4456, 2011.

LAMBERTINI, E.; KARNS, J. S.; VAN KESSEL, J. A. S.; CAO, H.; SCHUKKEN, Y. H.; WOLFGANG, D. R.; SMITH, J. M.; PRADHAN, A. K. Dynamics of *Escherichia coli* virulence factors in dairy herds and farm environments in a longitudinal study in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 4477-4488, 2015.

LANDINI, P. Cross-talk mechanisms in biofilm formation and responses to environmental and physiological stress in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 4, p. 259-66, 2009.

LANGONI, H.; GUIMARÃES, F. F.; COSTA, E. O. D.; JOAQUIM, S. F.; MENOZZI, B. D. Milk cellularity and colony forming units in mastitis caused by coagulase-positive staphylococci and coagulase negative. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 518-524, 2015.

LEFEBVRE, B.; DIARRA, M. S.; VINCENT, C.; MOISAN, H.; MALOUIN, F. Relative cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from beef cattle and humans. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, p. 357–364, 2009.

LE GALL, T.; CLERMONT, O.; GOURIOU, S.; PICARD, B.; NASSIF, X.; DENAMUR, E.; TENAILLON, O. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in

B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 11, p. 2373–84, 2007.

LEIMBACH, A.; POEHLEIN, A.; VOLLMERS, J.; GÖRLICH, D.; DANIEL, R.; DOBRINDT, U. No evidence for a bovine mastitis *Escherichia coli* pathotype. **BMC Genomics**, v. 18, p. 359, 2017.

LEIMBACH, A.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 358, p. 3-32, 2013.

LEOMIL, L.; AIDA-UGRINOVICH, L.; GUTH, B. E. C.; IRINO, K.; VETTORATO, M. P.; ONUMA, D. L.; CASTRO, A. F. P. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 97, p. 103-109, 2005.

LI, Y.; HAO, G.; GALVANI, C. D.; MENG, Y.; DE LA FUENTE, L.; HOCH, H. C.; BURR, T. J. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. **Microbiology**, v. 153, p. 719-726, 2007.

LOPEZ-SAUCEDO, C.; CEMA, J. F.; VILLEGAS-SEPULVEDA, N.; THOMPSON, R.; VELAZQUEZ, F. R.; TORRES, J.; TARR, P. I.; ESTRADA-GARCIA, T. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 127- 131, 2003.

LUKINMAA, S.; NAKARI, U. M.; EKLUND, M.; SIITONEN, A. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica**, v. 112, p. 908-29, 2004.

LUO, C.; WALK, S. T.; GORDON, D. M.; FELDGARDEN, M.; TIEDJE, J. M.; KONSTANTINIDIS, K. T. Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, p. 7200–7205, 2011.

LUO, H.; WAN, K.; WANG, H. H. High-frequency conjugation system facilitates biofilm formation and pAM_1 transmission by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2970–2978, 2005.

LYNCH, M.; O’CONNOR, L.; FOX, E.; JORDAN, K.; MURPHY, M. Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O111, O26, O103, O145 in Irish dairy cattle and raw milk: Prevalence and epidemiology of emergent stains. **Zoonoses Public Health**, v. 59, p. 264–271, 2012.

MACK, D., ROHDE, H., DOBINSKY, S., RIEDEWALD, J., NEDELMANN, M., KNOBLOCH, J. K.M. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3799-3807, 2000.

MADSEN, J. S.; BURMØLLE, M.; HANSEN, L. H.; SORENSEN, S. J. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 65, p. 183-195, 2012.

MAGALHÃES, V. FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, L. C. Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology – a technical review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MAIA, G. B. S.; PINTO, A. R.; MARQUES C. Y. T.; ROITMAN F. B.; LYRA, D. D. Produção leiteira no Brasil. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, v.37, p. 371-398, 2013. Disponível em <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3709.pdf>. Acesso em: 24 de Julho de 2017.

MAIDEN, M. C. J. Multilocus Sequence Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 561-588, 2006.

MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140–3145, 1998.

MAINIL, J. G.; FAIRBROTHER, J. M. Pathogenic *Escherichia coli* in domestic mammals and birds. In: Morabito, S.; editor. *Pathogenic Escherichia coli: molecular and cellular microbiology*. Norwich (UK): **Horizon Scientific Press and Caister Academic Press**; 2014.

MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, p. 2-12, 2013.

MAINIL, J. G. & DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1332-1344, 2005.

MAKOVEC, J. A. & RUEGG, P. L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3466–3472, 2003.

MARQUES, V. F.; SOUZA, M. M. S.; MENDONÇA, E. C. L.; ALENCAR, T. A.; PRIBUL, B. R.; COELHO, S. M. O.; LASAGNO, M.; REINOSO, E. B. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 161-170, 2013.

MATIAS, C. A. R.; PEREIRA, I. A.; REIS, E. M. F.; RODRIGUES, D. P.; SICILIANO, S. Frequency of zoonotic bacteria among illegally traded wild birds in Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 882-888, 2016.

MAY, T. & OKABE, S. *Escherichia coli* harbouring a natural IncF conjugative F plasmid develops complex mature biofilms by stimulating synthesis of colonic acid and curli. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 7479–7490, 2008.

MCCRATE, O. A.; ZHOU, X.; REICHHARDT, C.; CEGELSKI, L. Sumof the Parts: Composition and Architecture of the Bacterial Extracellular Matrix, **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 22, p. 4286-4294, 2013

MELLMANN, A.; HARMSSEN, D.; CUMMINGSM C. A.; ZENTZ, E. B.; LEOPOLD, S. R.; RICO, A.; PRIOR, K.; SZCZEPANOWSKI, R.; JI, Y.; ZHANG, W.; MCLAUGHLIN, S. F.; HENKHAUS, J. K.; LEOPOLD, B.; BIELASZEWSKA, M.; PRAGER, R.; BRZOSKA, P. M.; MOORE, R. L.; GUENTHER, S.; ROTHBERG, J. M.; KARCH, H. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. **PloS One**, v. 6, n. 7, p. e22751, 2011.

MIGUEL, P. R. R. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. Dissertação de Mestrado. **Universidade Estadual do Oeste do Paraná**, Paraná, 2010.

MINAGAWA, C. W. Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, de estirpe de *E. coli* e do meio ambiente em biotérios. 108 f. Dissertação de Mestrado. **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2007.

MOMTAZ, H.; DEHKORDI, S. F.; TAKTAZ, T.; REZVANI, A.; YARALI, S. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from bovine mastitic milk: serogroups, virulence factors, and antibiotic resistance properties. **The Scientific World Journal**, p. 2012: 618709, 2012.

MONEY, E. S.; CARTER, G. P.; SERRE, M. L. Modern space/time geostatistics using river distances: data integration of turbidity and *E. coli* measurements to assess fecal contamination along the rarity an river in New Jersey. **Environmental Science & Technology**, v. 43, p. 3736–3742, 2009.

MORE, S. J. Global trends in milk quality: implications for the Irish dairy industry. **Irish Veterinary Journal**, v. 62, n. 4, p. S5-S14, 2009.

MOURA L. B. & FERNANDES M. G. A incidência de infecções urinárias causadas por *E. coli*. **Revista Olhar Científico**, v. 01, p. 411 – 426, 2010.

MULLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, **Anais II Sul-Leite**, Toledo, PR, p. 206-217, 2002.

MUNDY, R.; SCHULLER, S.; GIRARD, F.; FAIRBROTHER, J. M.; PHILLIPS, A. D.; FRANKEL, G. Functional studies of intimin in vivo and ex vivo: implications for host specificity and tissue tropism. **Microbiology**, v. 153, p. 959–967, 2007.

NAGY, B. & FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6–7, p. 443-454, 2005.

NAGY, E.; MAIER, T.; URBAN, E.; TERHES, G.; KOSTRZEWA, M. Species identification of clinical isolates of Bacteroides by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 796-802, 2009.

NALLAPAREDDY, S. R.; DUH, R. W.; SINGH, K. V.; MURRAY, B. E. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 868–876, 2002.

NASCIMENTO, H. H.; SILVA, L.E. P.; SOUZA, R. T.; SILVA, N. P.; SCALETISKY, I.C. A. Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 184, 2014.

NATARO, J. P. & KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. **National Mastitis Council**, 1999.

NEMOY, L. L.; KOTETISHVILI, M.; TIGNO, J.; KEEFER-NORRIS, A.; HARRIS, A. D.; PERENCEVICH, E. N.; JOHNSON, J. A.; TORPEY, D.; SULAKVELIDZE, A.; MORRIS, J. G., JR.; STINE, O. C. Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1776-1781, 2005.

NIELSEN. Os produtos mais quentes do mundo. Disponível em: <<http://br.nielsen.com/reports/documents/WhatsHotInsightsonGrowthinFoodBeverageProductsBrPt.pdf>>. Acesso em: 27 de Julho de 2017.

NOLLER, A. C.; McELLISTREM, M. C.; STINE, O. C.; MORRIS J.G, J. R.,.; BOXRUD, D. J.; DIXON, B.; HARRISON, L. H. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 675–679, 2003.

NORMAN, K. N.; CLAWSON, M. L.; STROCKBINE, N. A.; MANDRELL, R. E.; JOHNSON, R.; ZIEBELL, K.; ZHAO, S.; FRATAMICO, P. M.; STONES, R.; ALLARD, M. W.; BONO, J. L. Comparison of whole genome sequences from human and non-human *Escherichia coli* O26 strains. **Frontier in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p.21, 2015.

OLIVER, D. M. & PAGE, T. Effects of seasonal meteorological variables on *E. coli* persistence in livestock feces and implications for environmental and human health. **Scientific Reports**, v. 6, p. 37101, 2016.

OLIVEIRA, L. P.; BARROS, L. S. S.; SILVA, V. C. Avaliação físico-química de leite cru e pasteurizado consumido no Recôncavo da Bahia. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 335-343, 2012.

OLIVEIRA, M. G.; BRITO, J. R.; GOMES, T. A. T.; GUTH, B. E. C.; VIEIRA, M. A. M.; NAVES, Z. V. F.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in food-producing animals in Brazil. **Int. Journal Food Microbiology**, v. 127, p. 139-46, 2008.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S. F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L. M.; BERNARDO, F.; VILELA, C. L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 118, p. 133–140, 2006.

ONG, C. L.; BEATSON, S. A.; MCEWAN, A. G.; SCHEMBRI, M. A. Conjugative plasmid transfer and adhesion dynamics in an *Escherichia coli* biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 6783–6791, 2009.

OTTO, A.; BERNHARDT, J.; HECKER, M.; BECHER, D. Global relative and absolute quantitation in microbial proteomics. **Current Opinion in Microbiology**, v.15, p.364–372, 2012.

PACHEPSKY, Y. A. & SHELTON, D. R. *Escherichia coli* and fecal coliforms in freshwater and estuarine sediments. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, p. 1067–1110, 2011.

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

PEACOCK, S. J.; DE SILVA, G. D. I.; JUSTICE, A.; COWLAND, A.; MOORE, C. E.; WINEARLS, C. G.; DAY, N. P. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3764–3770, 2002.

PEI, Y.; TERAJIMA, J.; SAITO, Y.; SUZUKI, R.; TAKAI, N.; IZIMIYA, H.; MORITA-ISHIHARA, T.; OHNISHI, M.; MIURA, M.; IYODA, S.; MITOBE, J.; WANG, B.; WATANABE, H. Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates dispersed across Japan by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. **Japan Journal of Infection Diseases**, v. 61, p. 58-64, 2007.

PEREIRA, M. A.; BORGES, E. F. C.; PEREIRA, M. G.; REZENDE, T. N.; PEREIRA, T. C.; ARAUJO, P. P. Influência da água na qualidade do leite produzido em propriedades localizadas no município de três corações, Estado de Minas Gerais, Brasil. **III Simpósio de Qualidade do Leite**. 2016.

PÉREZ-LOSADA, M.; CABEZAS, P.; CASTRO-NALLAR, E.; CRANDALL, K. A. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 38-53, 2013.

PERSING, D. H (Ed.) Molecular microbiology: diagnostic principles and practice. Washington: **ASM Press**, v. 15, p. 185-196, 2004.

PIAZZA, R. M. F.; ABE, C. M.; HORTON, D. S. P. Q.; MILIWEBSKY, E.; CHINEN, I.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. Detection and subtyping methods of diarrheagenic *Escherichia coli* strains. **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**, v. 7, p. 95-115, 2010.

PICIOREANU, C.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Community Structure and Co-operation in Biofilms. In: ALLISON, D. G.; GILBERT, P.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; WILSON, M. editors. **Society for General Microbiology**, p. 129-166, 2000.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETT, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PINZÓN-SANCHEZ, C. & RUEGG, P. L. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 3397–3410, 2011.

PRUSS, B. M.; BESEMANN, C.; DENTON, A.; WOLFE, A. J. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 3731-9, 2006.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica Veterinária – Um tratado de Doenças dos Bovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. 9ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 541-629, 2000.

RAJKHOWA, S.; DAS, R.; BORA, S.; RAJKHOWA, C.; RAHMAN, H.; BUJARBARUAH, K. M. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* in faecal samples of healthy mithun (*Bos frontalis*) by multiplex polymerase chain reaction. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 6, p. 397-401, 2010.

RAMOS, S.; SILVA, N.; DIAS, D.; SOUSA, M.; CAPELO-MARTINEZ, J. L.; BRITO, F.; CANIÇA, M.; IGREJAS, G.; POETA, P. Clonal diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* in pigs at slaughter level in Portugal. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 1, 2013.

RANJBAR, R.; KARAMI, A.; FARSHAD, S.; GIAMMANCO, G. M.; MAMMINA, C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. **The new microbiologica**, v. 1, n.37, p.1-15, 2014.

RATAJCZAK, M.; LAROCHE, E.; BERTHE, T.; CLERMONT, O.; PAWLAK, B.; DENAMUR, E.; PETIT, F. Influence of hydrological conditions on the *Escherichia coli* population structure in the water of a creek on a rural watershed. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 222, 2010.

REGUA-MANGIA, A. H. Métodos moleculares na vigilância epidemiológica de doenças infecciosas. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde**, on-line. 2015.

REISNER, A.; HOLLER, B. M.; MOLIN, S.; ZECHNER, E. L. Synergistic effects in mixed *Escherichia coli* biofilms: conjugative plasmid transfer drives biofilm expansion. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 3582–3588, 2006.

RESTIERI, C.; GARRISS, G.; LOCAS, M. C.; DOZOIS, C. M. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1553–1562, 2007.

- RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R.; CAMERON, D. N.; HUNTER, S. B.; SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J. Standardization of pulsed-field gelelectrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Shigella* spp. for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, p. 59-67, 2006.
- RICHTER, S. S.; SERCIA, L.; BRANDA, J. A.; BURNHAM, C. A.; BYTHROW, M.; FERRARO, M. J.; MANJI, R. Identification of Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 12, p. 1571-1578. 2013.
- RIGOBELLO, E. C.; GAMEZ, H. J.; MARIN, J. M.; MACEDO, C.; AMBROSIN, J. A.; ÁVILA, F. A. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 305-310, 2006.
- ROMERO, L. L.; LOPEZ, L.; MARTINEZ-MARTINEZ, B.; GUERRA, J. R.; HERNANDEZ, A. P. Characterization of the first CTX-M-14-producing *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* isolate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 1113–1114, 2004.
- SABAT, A. J.; BUDIMIR, A.; NASHEV, D.; SÁ-LEÃO, R.; VAN DIJL, J. M.; LAURENT, F.; GRUNDMANN, H.; FRIEDRICH, A. W.; ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveillance**, v. 18, n. 4, p. 20380, 2013.
- SABATÉ, M.; PRATS, G.; MORENO, E.; BALLESTE, E.; BLANCH, A. R.; ANDREU, A. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. **Research in Microbiology**, v. 159, p. 288-293, 2008.
- SAMANTHA, I.; JOARDAR, S. N.; DAS, P. K.; SAR, T. K. Comparative possession of Shiga toxin, intimin, enterohaemolysin and major extended spectrum beta lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolated from backyard and farmed poultry. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 90-93, 2015.
- SANTOS, M. V. & FONSECA, L. F. L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. **Manole**, p. 314, 2007.
- SANTOS, F. G. P.; MOTA, R. A.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SOUZA, H. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; JOHNER, J. M. Q.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P.; LEAL-BALBINO, T. C. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with subclinical mastitis and milking equipment from the state of Pernambuco. **Napgama**, v. 6, p. 19-23, 2003.
- SANTOS, M. V. & FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotóxicas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.
- SAYAL, P.; SANDHU, R.; SINGH, K.; DEVI, P. Slime Production Among Uropathogenic Bacterial Isolates: Evaluating Different Phenotypic Detection Methods. **Annals of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 04, n. 01, p. A48-53, 2017

SCHAUDER, S.; SHOKAT, K.; SURETTE, M. G.; BASSLER, B. L. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 463-76, 2001.

SCHEMBRI, M. A.; KJAERGAARD, K.; KLEMM, P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 253-67, 2003.

SCHUBERT, M. N. & NIEDERLE, P. A. Estratégias competitivas do cooperativismo na cadeia produtiva do leite: o caso da Ascooper, SC. **Anais do 47º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**, Porto Alegre, RS, 2009. Disponível em <<http://www.sober.org.br/palestra/13/104.pdf>>. Acesso em: 25 de Julho de 2017.

SCHWARTZ, D. C. & CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 67-75, 1984.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, v. 34, p. 475–491, 2003.

SELANDER, R. K.; CAUGANT, D. A.; WHITTAM, T. S. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology. NEIDHARDT, F. C.: INGRAHAM, J. L.: MAGASANIK, B.; LOW, K. B.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H. E. (eds). **American Society of Microbiology**, p. 1625-1648, 1987.

SEYDA, C.; GÖKÇEN, D.; ÜNLÜ, S. M. Detection of several virulence properties, antibiotic resistance and phylogenetic relationship in *E. coli* isolated from cow mastitis. **Acta Veterinaria Beograd**, v. 64, p. 413-425, 2014.

SHELDON, I. M., RYCROFT, A. N.; DOGAN, B.; CRAVEN, M.; BROMFIELD, J. J.; CHANDLER, A.; ROBERTS, M. H.; PRICE, S. B.; GILBERT, R. O.; SIMPSON, K.W. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. **PLoS One**, v. 5, p. e9192, 2010.

SHEPARD, S. M.; DANZEISEN, J. L.; ISAACSON, R. E.; SEEMANN, T.; ACHTMAN, M.; JOHNSON, T. J. Genome Sequences and Phylogenetic Analysis of K88- and F18- Positive Porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, p. 395– 405, 2012

SIEGRIST, T. J.; ANDERSON, P. D.; HUEN, W. H.; KLEINHEINZ, G. T.; McDERMOTT, C. M.; SANDRIN, T. R. Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 3, p. 554-62, 2007.

SILVA, V. O.; SOARES, L. O.; JÚNIOR, A. S.; MANTOVANI, H. C.; CHANG, Y.; MOREIRA, M. A. S. Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 6136–6145, 2014.

SILVA, E.; LEITAO, S.; TENREIRO, T.; POMBA, C.; NUNES, T.; LOPES DA COSTA, L.; MATEUS, L. Genomic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates recovered from the uterus of puerperal dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p. 6000–6010, 2009.

SILVEIRA, W. D.; FERREIRA, A.; LANCELLOTTI, M.; BARBOSA, I. A. G. C. D.; LEITE, D. S.; CASTRO, A. F. P.; BROCCHI, M. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 89, p.323-328, 2002.

SIMÕES, M.; SIMÕES L. C.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA M. J. Control of flow-generated biofilms using surfactants-evidence of resistance and recovery. **Food and Bioprocess Technology**, v. 84, n.4, p. 338-345, 2006.

SINGH, A.; GOERING, R. V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S. L.; ZERVOS, M. J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.

SINTCHENKO, V. & GALLEGGO, B. Laboratory-Guided Detection of Disease Outbreaks Three Generations of Surveillance Systems. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 133, p. 916-925, 2009.

SMITH, K. L.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S. Environmental mastitis: Cause, prevalence, prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 1531–1553, 1985.

SOARES, B. S. Aplicação de técnicas moleculares para o monitoramento da diversidade genética de *Staphylococcus aureus* em ambientes de produção leiteira. 80f. Tese de Doutorado. **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro. 2017.

SOLL, D. R.; LOCKHART, S. R.; PUJOL, C. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. In MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed., **ASM Press, Washington, D. C.**, v. 1. p. 139–167, 2003.

SOLO-GABRIELE, H. M.; WOLFERT, M. A.; DESMARAIS, T. R.; PALMER, C. J. Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 230-237, 2000.

SON, I.; VAN KESSEL, J. A.; KARNS, J. S. Genotypic diversity of *Escherichia coli* in a dairy farm. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, p. 837–847, 2009.

SORENSEN, S. J.; BAILEY, M.; HANSEN, L. H.; KROER, N.; WUERTZ, S. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 700–710, 2005.

SUOJALA, L.; POHJANVIRTA, T.; SIMOJOKI, H.; MYLLYNIEMI, A.; PITKALA, A.; PELKONEN, S.; PYORALA, S. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 147, p. 383–388, 2011.

SUZUKI, M. T. & GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 625-630, 1996.

SYDOW, A. C. M. D.G. V. Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes. 89 f. Dissertação de Mestrado. **Universidade de São Paulo**. São Paulo, 2005.

TADEPALLI, S.; PRUDHIVI, S.; MYNENI, D. R. B.; RAO, D. S. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* isolates and its association with extended spectrum betalactamase production and drug resistance. **Saudi Journal of Pathology and Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 60-64, 2016.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T.; MATSUO, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151-153, 1988.

TAVAKOLI, M. & POURTAGHI, H. Molecular detection of virulence genes and multi-drug resistance patterns in *Escherichia coli* (STEC) in clinical bovine mastitis: Alborz province, Iran. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 18, n. 3, p. 208-211, 2017.

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of comensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207-17, 2010.

TENG, L. J.; HSUEH, P. R.; LIAW, S. J.; HO, S. W.; TSAI, J. C. Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. **Journal of Microbiology Immunology Infection**, v. 37, n. 6, p. 327-334, 2004.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 426-439, 1997.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

TERAJIMA, J.; IZUMIYA, H.; IYODA, S. High genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan and its applicability for the detection of diffuse outbreak. **Journal of Japan Association of Infection Diseases**, v. 55, p.19-22, 2002.

THIRY, D.; SAULMONT, M.; TAKAKI, S.; DE RAUW, K.; DUPREZ, J. N.; IGUCHI, A.; PIÉRARD, D.; MAINIL, J. G. Enteropathogenic *Escherichia coli* O80:H2 in young calves with diarrhea, Belgium. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 12, 2017.

TOUCHON, M.; HOEDE, C.; TENAILLON, O.; BARBE, V.; BAERISWYL, S.; BIDET, P.; et al. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. **PLoS Genet.**, v. 5, n. 1, p. e1000344, 2009.

TRABULSI, L. R. V.; KELLER, R. V.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Emerging Infectious Disease**, v. 5, p. 508- 513, 2002.

TURNER, K. M. E. & FEIL, E. J. The secret life of the multilocus sequence type. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 129–135, 2007.

USDA, United States Department of Agriculture. 2017. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/downloads>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2018.

USDA, United States Department of Agriculture. Brazil Dairy and Products Annual Dairy Report, **BR0979**, 2015.

USDA. United States Department of Agriculture. 2007b. Dairy 2007: Part V: Changes in dairy cattle health and management practices in the United States, 1996–2007. USDA National Animal Health Monitoring Service. Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_dr_PartV_rev.pdf. Acesso em: 26 de Setembro de 2017.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N. K.; BRISSE, S. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 1-46, 2007.

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

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANA, K. S. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.179-185, 2003.

VICENTE, H. I. G.; AMARAL, L. A.; CERQUEIRA, A. M. F. Shiga toxigenic *Escherichia coli* serogroups O157, O11 and O113 in feces, water and milk samples from dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 217-222, 2005.

VOGELEER, P.; TREMBLAY, Y. D. N.; JUBELIN, G.; JACQUES, M.; HAREL, J. Biofilm forming abilities of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates associated with human infections. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 1448 –1458, 2016.

WALK, S.T.; ALM, E.W.; CALHOUN, L. M.; MLADONICKY, J. M.; WHITTAM, T. S. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 2274–2288, 2007.

WATANABE, H.; WADA, A.; INAGAKI, Y. Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan. **Lancet**, p. 831-832, 1996. 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. 3408–12, 2006.

WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F. B.; MCSWEENEY, K. D.; DINSMORE, R. P.; GOODELL, G.; CALLAN, R. J. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 976–981, 2001.

WELCH, R.A. The Genus *Escherichia*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSEMBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. The Prokaryotes: A handbook on the Biology of Bacteria, Proteobacteria: Gamma Subclass. New York, USA: **Springer Science**, v. 6, p. 60-71, 2006.

WIRTH, T.; FALUSH, D.; LAN, R.; COLLES, F.; MENSA, P.; WIELER, L. H.; KARCH, H.; REEVES, P. R.; MAIDEN, M. C.; OCHMAN, H.; ACHTMAN, M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. **Molecular Microbiology**, v. 60, p. 1136–1151, 2006.

YAMAMOTO, S. & HARAYAMA, S. PCR amplification and directsequencing of *gyrB* genes with universal primers and theirapplication to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1104–1109, 1995.

YU, FEL.; CHEN, XIAO.; ZHENG, SHUFA.; HAN, DONGSHENG.; WANG, YIYIN.; WANG, RUONAN.; WANG, BAOHONG.; CHEN, YU. Prevalence and Genetic Diversity of Human Diarrhoeagenic *Escherichia coli* Isolates by Multilocus Sequence Typing. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 67, p. 7-13, 2018.

ANEXOS

ANEXO 1 – Caracterização dos animais estudados.

Animais	CCS (x mil/mL)	CMT(AD/PD/AE/PE)		
		Coleta 1 (30/06/2014) Inverno	Coleta 2 (07/07/2014) Inverno	Coleta 3 (14/07/2014) Inverno
Sertaneja	589	-/-/+	-/-/+++	- /- /- /+++
Demetria	76	-/-/+++	-/-/++/-	+/-/+/-
Borboleta	1057	+/+/-/+++	-/-/+++/-	-/-/-/+++
Alteza	729	-/-/-	+++ /+++ /- /+++	++ /+++ /+++ /+++
Fortuna	51	-/-/-	-/-/+/-	-/-/-
Carla	6863	-/+/-/+++	-/-/+++ /+	- /+++ /- /+++
Cinderela	547	-/-/+	-/+/-	-/-/+
Paola	793	-/-/+	-/-/+++ /-	- /+++ /+++ /+++
Leila	1263	-/-/+++ /+	'+++ /+++ /- /+	+++ /+++ /+++ /+++
Nara	717	-/-/+++ /-	+++ /+++ /- /+++	+++ /+++ /+++ /+
Beijoqueira	68	-/-/-	-/-/+/-	-/-/+
Jandira	343	-/-/+/-	-/-/+++ /-	- /+++ /- /-
Melissa	133	-/-/+	-/-/+	-/-/+
Helô	177	+/-/-	+/-/+/-	- /+ /-
Holanda	99	-/-/-	-/-/-	+ /- /-
Adelaide	48	-/-/-	-/-/-	- /- /-
Chalana	441	+/-/-	+/-/+/-	+++ /- /-
Bandeira	340	+/-/+++	- /+++ /- /+	- /+ /+++ /+
Janga	386	-/-/-	-/-/+	- /- /-
Naiara	91	-/-/-	-/-/-	- /- /-
Mari	629	-/+/-	-/-/-	+++ /- /+++ /-
Elizangela	149	-/-/-	-/-/-	- /- /-
Barcelona	118	-/-/-	-/-/-	- /+ /-
Raina	16	-/-/-	-/-/-	- /+ /+++ /-
Imperatriz	600	-/-/+/-	- /+ /-	- /+ /+++ /+
Baixinha	575	-/-/+	- /+ /-	- /- /+++
Nina	19	-/-/-	+/-/+/-	- /- /-
Hungria	107	-/-/-	-/-/-	- /- /-
Chalô	8	-/-/-	-/-/-	- /- /-
Magnolia	25	-/-/-	-/-/-	- /- /-
Julieta	877	+++ /- /+++ /+	-	-
Luneta	-	-	- /- /+/-	- /- /-

Animais	CCS (x mil/mL)	CMT(AD/PD/AE/PE)		
		Coleta 1 (13/10/2014) Primavera	Coleta 2 (20/10/2014) Primavera	Coleta 3 (27/10/2014) Primavera
Alteza	307	+/-/-/-	++/-/-/-	++/-/-/-
Gaucha	242	-/++/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Princesa	272	-/-/+/>+	-/-/++/>+	-/-/+/>+
Cabocla	793	-/+/>+/>+	-/++/>+/>+/>+	-/++/>+/>+/>+
Seropédica	142	-/-/+/>-	-/-/-/-	++/-/+/>-
Aline	100	+/-/-/-	-/-/-/-	-/++/>+/>+/>+
Chalana	9999	+++/-/++/>+	+++/-/++/>+	+++/>+/>+/>+/>-
Duqueza	1582	-/++/>+/>+/>+	+++/>+/>+/>+/>+/>+	+++/>+/>+/>+/>+/>+
Quatá	46	-/-/+/>-	-/-/-/-	-/-/-/-
Jangada	730	+/>+/>-/+/>+	-/-/++/>+	+/>+/>+/>+/>+/>+
Farroma	354	-/-/-/-	-/-/-/+	++/-/-/-
Tizil	273	-/-/-/-	+/>-/+/>+/>-	-/-/++/>+/>-
Mineira	1618	-/++/>+/>+/>+	-/++/>+/>+/>-	+/>+/>+/>+/>+/>+/>+
Brasil	269	-/-/-/+/>+	-/-/-/+/>+	-/-/+/>+/>+/>+
Lua	10	-/+/>-/-	+/>-/-/-	-/-/-/-
Belgica	360	+/>+/>+/>-/-	-/-/-/+	-/-/-/-
Estrela	12	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/+/>-
Amazonia	4	++/-/++/>-	+++/-/-/-	+/>-/+/>-
Floresta	12	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Astra	171	-/+/>-/-	-/++/>+/>-/-	+/>-/-/-
Gaiola	1	-/-/-/-	-/-/-/+	-/+/>-/-
Carioca	1071	+++/-/-/-	-/-/++/>+/>+	+++/-/++/>+/>-
Rifaine	423	+/>+/>+/>+/>+/>+	-/-/-/-	-/-/-/-
Dondoca	17	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Nirvana	1	+/>+/>-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Novela	15	-/-/+/>-	-/-/-/-	-/-/-/-
Passa vinte	346	+/>-/-/-	-/++/>+/>-/-	-/++/>+/>-/-
Laica	1429	++/>+/>+/>+/>+/>+/>+	+++/>+/>+/>+/>+/>+/>+	+/>-/+/>+
Marisa	815	+/>-/+/>-	++/>+/>+/>+/>+/>+	-/-/-/-
Monaliza	139	++/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Boneca	52	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Chica	897	-/-/+/>+	+/>+/>-/-	+++/>+/>+/>+/>-
Bia	428	-/-/-/-	-/-/+/>+	++/>-/+/>+/>+/>+
Catita	19	-/-/-/-	++/>+/>+/>+/>-	-/+/>+/>-
Pretinha	120	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Siriema	74	-/-/-/-	-/-/-/-	-/+/>-/-
Pombinha	4483	-/-/+/>+	-/-/-/+/>+	-/-/-/+

Animais	CCS (x mil/mL)	CMT(AD/PD/AE/PE)		
		Coleta 1 (09/03/2015) Verão	Coleta 2 (16/03/2015) Verão	Coleta 3 (23/03/2015) Verão
Mellita	430	-/-/+/+	-/-/+/+/+	-/-/+/+/+/+
Magal	160	-/+/-/-	-/+/-/-	-/+/-/-
Baleia	1439	-/+/+/-/+/+	-/+/+/+/-/+/+	-/+/+/+/-/+/+
Nublada	6920	-/+/+/+/-/+/+	-/-/-/-	-/-/-/+/+
Beijo	89	-/+/+/+/+/+/+	-/-/-/-	-/-/-/-
Dorinha	170	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Magrela	3829	+/+/+/+/+/+/+/+	-/+/+/-/+/+	+/+/+/+/+/+/+/+
Gaiola	282	+/+/-/+	-/-/-/+/+	+/+/-/+
Gabriela	11	-/-/-/-	-/-/-/-	-
Boa Sorte	-	-	-	+/-/-/-

Animais	CCS (x mil/mL)	CMT(AD/PD/AE/PE)		
		Coleta 1 (18/05/2015) Outono	Coleta 2 (25/05/2015) Outono	Coleta 3 (01/06/2015) Outono
Bertioga	135	-/-/+/-	-/-/-/+	+/+/-/-
Castanha	1957	+/+/+/+/+/+	+/+/+/+/-	+/+/+/+/+/+/+/+
Braúna	5471	+/-/+/+	-/+/+/-/-	-
Gaiola	1986	+/+/+/+	+/+/+/+	+/+/+/+/+/+/+/+
Americana	1583	-/+/+/-/+/+	'-/-/+/+/+/+	-/-/+/+/+/+
Mamona	5731	+/+/+/+/+/+/+	+/+/+/+/+/+/+	+/+/+/+/+/+/+/+
Rani	657	-/+/-/+	+/+/-/+/+/+	+/+/+/-/+/+/+
Naiara	1022	-/-/-/+/+	-/-/-/+/+	-/-/+/+/+/-
Morena	771	-/-/+/+/-	+/+/+/-/-	+/+/+/-/+/+/+
Sol	5816	+/+/+/+/+/-	+/+/+/-/+/+/-	+/+/+/-/+/+/-
Amora	237	-/-/-/-	-	-
Meia-noite	262	+/+/-/-	+/+/-/-	+/+/-/-
Marlene	96	-/-/-/-	-/+/+/-/+/+	+/+/+/+/+/+/+/+
Castanhola	176	-/-/-/-	-/-/-/-	-
Bragança	7033	+/+/+/-/+/+/+/+	+/+/+/+/-/+/+/+	-
Riqueza	363	-/+/-/-	-/-/-/-	-/-/+/+/+
Pantanal	1984	+/+/+/+/+/+/+	-/+/+/-/-	+/+/+/+/-/+/+/+

ANEXO 2 – Perfil de virulência gerado para selecionar 30 cepas de *E. coli* para a técnica de PFGE realizada na UNRC – Argentina.

Perfil	<i>eaeA</i>	<i>stxI</i>	<i>stxII</i>	<i>ST</i>	<i>LT</i>	<i>lal</i>	<i>eagg</i>	<i>fimH</i>	<i>csgA</i>	<i>flu</i>
P1								+	+	
P2	+							+	+	+
P3	+							+		+
P4					+			+	+	+
P5										+
P6	+							+	+	
P7	+				+			+	+	
P8	+							+		
P9	+									
P10	+	+						+	+	+
P11								+	+	+
P12									+	
P13								+		
P14					+			+	+	
P15		+						+	+	
P16		+						+	+	+
P17								+		+
P18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anexo 3 – Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes em amostras de água coletadas em cinco pontos distintos da propriedade de acordo com as estações do ano.

Estação	Origem da água	Coliformes Totais (NMP/100mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/100mL)
Inverno	Poço	130	350
	Açude	110	26
	Bebedouro	2	2
	Torneira	1600	300
	Riacho	32	300
Primavera	Poço	300	30
	Açude	-	-
	Bebedouro	1600	1600
	Torneira	900	11
	Riacho	1600	1600
Verão	Poço	1600	23
	Açude	1600	50
	Bebedouro	1600	110
	Torneira	1600	50
	Riacho	1600	1600
Outono	Poço	1600	500
	Açude	1600	80
	Bebedouro	300	17
	Torneira	900	80
	Riacho	1600	280

ANEXO 4 – Dados específicos das cepas estudadas.

Amostras	Cepas	Produção de biofilme	Perfil de virulência	Cepas selecionadas para o PFGE
Cadeia Produtiva	N9	-	P18	-
	N22	FRACO	P1	-
	N57	FRACO	P11	-
	N59	FRACO	P13	SIM
	N64	FRACO	P1	-
	N69	FRACO	P11	SIM
	N71	FRACO	P18	SIM
	N72	-	P1	SIM

Amostras	Cepas	Produção de biofilme	Perfil de virulência	Cepas selecionadas para o PFGE
Água	A8	FRACO	P1	-
	A10	FRACO	P18	SIM
	A11	FRACO	P1	-
	A13	FRACO	P1	-
	A14	FRACO	P1	-
	A16	FRACO	P1	-
	A18	-	P1	-
	A19	FRACO	P1	-
	A21	FRACO	P1	-
	A22	FRACO	P1	-
	A24	FRACO	P1	SIM
	A25	-	P1	-
	A26	-	P11	-
	A28	-	P11	SIM
A29	-	P11	-	

Amostras	Cepas	Produção de biofilme	Perfil de virulência	Cepas selecionadas para o PFGE
Leite	N1	-	P18	-
	N3	FRACO	P1	-
	N5	FRACO	P6	SIM
	N8	FRACO	P1	-
	N12	-	P8	SIM
	N13	FRACO	P9	-
	N14	-	P1	-
	N15	FRACO	P9	SIM
	N18	-	P18	-
	N21	-	P1	-
	N29	-	P1	-
	N30	FRACO	P1	-
	N31	-	P1	-
	N32	FRACO	P1	-
	N33	FRACO	P1	-
	N35	-	P1	-
	N36	-	P1	-
	N37	-	P1	-
	N39	-	P1	-
	N40	-	P1	-
	N42	FRACO	P13	-
	N43	-	P1	-
	N45	-	P1	-
	N46	MODERADO	P13	SIM
	N47	FRACO	P1	-
	N48	FRACO	P1	SIM
	N49	-	P1	-
	N51	-	P1	-
	N53	-	P1	-
	N55	-	P1	-
	N56	FRACO	P1	-
N65	FRACO	P12	SIM	
N66	FRACO	P1	SIM	
N67	FRACO	P11	SIM	

Amostras	Cepas	Produção de biofilme	Perfil de virulência	Cepas selecionadas para o PFGE
Fezes	F1	FRACO	P1	-
	F2	FRACO	P10	SIM
	F3	-	P6	-
	F4	-	P1	-
	F5	-	P6	-
	F6	-	P1	-
	F7	-	P1	-
	F8	-	P1	-
	F9	-	P1	-
	F10	FRACO	P6	-
	F11	-	P1	-
	F12	-	P1	-
	F13	FRACO	P3	SIM
	F14	-	P11	-
	F15	-	P2	-
	F17	-	P16	SIM
	F18	-	P1	-
	F20	-	P11	-
	F21	-	P11	-
	F22	-	P11	-
	F23	-	P6	-
	F25	FORTE	P6	-
	F26	FRACO	P2	SIM
	F27	-	P6	SIM
	F28	-	P11	-
	F29	-	P1	-
	F30	-	P6	-
	F32	FRACO	P1	-
	F33	FRACO	P11	-
	F34	FRACO	P1	-
	F35	-	P4	-
	F36	-	P11	-
	F37	-	P11	-
	F39	FRACO	P1	-
	F41	-	P4	-
	F42	-	P4	-
	F43	-	P1	-
	F44	FRACO	P1	-
	F45	-	P14	-
	F46	-	P5	SIM
	F47	-	P4	-
	F48	-	P11	-
	F49	-	P11	-
	F50	FRACO	P14	SIM
	F51	-	P11	-
	F52	-	P6	-
	F53	FRACO	P14	-
	F54	-	P7	-
	F55	-	P8	SIM
	F56	FRACO	P6	-
	F57	-	P14	-
	F58	-	P12	-
	F59	FRACO	P7	SIM
	F60	FRACO	P1	-

Amostras	Cepas	Produção de biofilme	Perfil de virulência	Cepas selecionadas para o PFGE
Fezes	F61	-	P11	-
	F62	FRACO	P11	-
	F63	FORTE	P4	SIM
	F64	-	P15	SIM
	F65	FRACO	P1	-
	F66	MODERADO	P1	-
	F67	-	P1	-
	F68	-	P11	-
	F69	-	P1	-
	F70	-	P11	-
	F71	-	P1	-
	F72	-	P1	-
	F73	-	P15	-
	F74	FRACO	P11	-
	F77	-	P11	-
	F78	FRACO	P11	-
	F80	-	P12	SIM
	F81	-	P1	-
	F82	-	P11	-
	F83	-	P11	-
	F84	FORTE	P1	-
	F85	-	P11	-
	F86	FORTE	P1	SIM
	F87	FRACO	P11	-
	F88	-	P1	-
	F89	FRACO	P1	-
	F90	-	P11	-
	F91	FRACO	P11	SIM
	F92	-	P13	SIM
	F93	-	P1	-
	F94	-	P1	-
	F95	FRACO	P1	-
	F96	FRACO	P11	-
	F97	-	P1	-
	F98	-	P1	-
	F99	-	P1	-
	F100	-	P11	-