



JAMILA PALHARES DE JESUS FARIA

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

LAVRAS - MG

2017

JAMILA PALHARES DE JESUS FARIA

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

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa
Orientador

Profa. Dra. Gláucia Frasnelli Mian
Profa. Dra. Gleí dos Anjos de Carvalho e Castro
Coorientadoras

**LAVRAS - MG
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Faria, Jamila Palhares de Jesus.

Fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas
de mastite bovina / Jamila Palhares de Jesus Faria. - 2017.

61 p.

Orientador: Geraldo Márcio da Costa.

Coorientadoras: Gláucia Frasnelli Mian, Gleí dos Anjos de
Carvalho e Castro.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. *Escherichia coli*. 2. Mastite. 3. Virulência I. Costa, Geraldo
Márcio da. II. Mian, Gláucia Frasnelli. III. Carvalho e Castro, Gleí
dos Anjos de. IV. Título.

JAMILA PALHARES DE JESUS FARIA

**FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* DE
MASTITE BOVINA
*VIRULENCE FACTORS IN ISOLATES OF ESCHERICHIA COLI FROM
BOVINE MASTITIS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de março de 2017.

| | |
|--|--------|
| Profa. Dra. Gláucia Frasnelli Mian (coorientadora) | UFLA |
| Profa. Dra. Elizângela Guedes | FACICA |
| Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli | UFLA |

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa
Orientador

Profa. Dra. Gleí dos Anjos de Carvalho e Castro
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2017**

*À minha família, minha mãe, minha irmã e ao meu marido pelo amor e carinho
sempre*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta dissertação foi um desafio e, ao mesmo tempo, um presente que a vida me deu, sendo possível graças a grandes pessoas que Deus colocou em meu caminho.

Por isso, agradeço a Deus, em primeiro lugar, pela força para concluir mais uma etapa em minha vida,

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias – UFLA – pela oportunidade de realização do curso.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA pelos conhecimentos passados durante o período das disciplinas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento ao projeto.

Ao meu orientador, Dr. Geraldo Márcio da Costa, por receber tão bem meu projeto, ensinando-me com paciência e carinho, cada etapa deste trabalho, transmitindo seus conhecimentos, sempre me auxiliando, tornando possível a conclusão desta dissertação.

À minha coorientadora, Dra. Gleí, por sempre me auxiliar prontamente, quando surgiam dúvidas, passando suas experiências científicas.

À Dra. Gláucia, por aceitar ser minha coorientadora e participar da banca avaliadora da dissertação sempre contribuindo com seus conhecimentos.

À Dra. Elizângela e à Dra. Roberta, pela colaboração como membros da banca avaliadora da dissertação.

À Dra. Christiane, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – UFLA – pela atenção, carinho e grande auxílio, principalmente, em relação à estatística.

À minha grande amiga Juliana, pela amizade, carinho, sempre disposta a me ajudar, em qualquer horário, acalmando-me nos momentos mais difíceis e se tornando uma pessoa muito importante para mim.

À Dircéia, Núbia, Esteffany, Rafaella e a todos do Laboratório de Bacteriologia e do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA pelo carinho e auxílio na execução do experimento.

À Dona Lola, pela moradia, carinho e cumplicidade, juntamente com todos os amigos que fiz na pensão.

À Larissa, pela amizade e pela companhia nas idas ao laboratório à noite.

Às minhas grandes amigas, Beatriz, Luana Leite, Camila, Luana Medeiros, Paula, Angelina, Aryenne pelo apoio e por sempre torcerem por mim.

À minha mãe Magda e à minha irmã Cyntia, pelo amor e pelo grande apoio, em todos os momentos da minha vida, aconselhando-me nos momentos mais difíceis, amo vocês.

Ao meu marido Douglas, pessoa fundamental em minha vida, essencial para conclusão desta etapa, estando ao meu lado, em todos os momentos, apoiando-me de forma inexplicável, dando-me forças para continuar e não medindo esforços para me ajudar. Eu o amo.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá.

RESUMO

A mastite bovina é considerada uma das mais importantes e onerosas doenças infecciosas da bovinocultura leiteira. Dentre as bactérias associadas à mastite, destaca-se *Escherichia coli* como um dos principais agentes causadores da infecção intramamária, em rebanhos leiteiros e associada a sinais clínicos severos. Este trabalho teve por objetivo classificar isolados de *E. coli*, em relação ao grupo genético (B1, B2, A e D) e avaliar a frequência dos genes de virulência *fliC*, *F17*, *escN*, *lpfA* e *icm* de importância para *E. coli* mamária, em 69 isolados de mastite bovina e 31 isolados de ambiente (fezes), coletados em diferentes rebanhos leiteiros, na região de Lavras – MG. De acordo com os nossos resultados, o grupo genético B1 prevaleceu com 56,52% dos isolados de mastite, seguido pelo grupo B2 com 39,13%. Foram definidos oito perfis de virulência de acordo com a frequência dos genes estudados. O perfil 5 foi o mais frequente, destacando-se os genes *fliC* e *escN* com prevalência de 73,91% e 55,07% dos isolados de mastite, enquanto o gene *lpfA* foi detectado em 17,39%. Os genes *icm* e *F17* não foram detectados. As manifestações decorrentes das infecções intramamárias por *E. coli* são determinadas pela expressão de diferentes fatores de virulência, destacando-se os genes *fliC*, *escN* e *lpfA* como os mais relevantes neste estudo.

Palavras-chave: MPEC. SST3. Genes de virulência. Mastite ambiental.

ABSTRACT

Bovine mastitis is considered one of the most important and costly infectious diseases of dairy cattle. Among the bacteria associated with mastitis, *Escherichia coli* is one of the main agents that causes intramammary infection in dairy herds and is associated with severe clinical signs. The objective of this study was to classify isolates of *E. coli* in relation to the genetic group (B1, B2, A and D) and to evaluate the frequency of the virulence genes *fliC*, *F17*, *escN*, *lpfA* and *icm* of importance for *E. coli* mammary in 69 bovine mastitis isolates and 31 environmental isolates (faeces) collected in different dairy herds in the region of Lavras - MG. According our results, the B1 genetic group prevailed with 56.52% of the mastitis isolates followed by the B2 group with 39.13%. Eight virulence profiles were defined according to the frequency of the genes studied. Profile 5 was the most frequent, highlighting the *fliC* and *escN* genes with prevalence of 73.91% and 55.07% of the mastitis isolates while the *lpfA* gene was detected in 17.39%. The *icm* and *F17* genes were not detected. The manifestations resulting from intramammary infections caused by *E. coli* are determined by the expression of different virulence factors, with the *fliC*, *escN* and *lpfA* genes being the most relevant in this study.

Keywords: MPEC. SST3. *Virulence genes. Environmental mastitis.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Árvore decisória para determinação do grupo genético de isolados de *E. coli* utilizando os resultados das amplificações da PCR dos genes *chua*, *yjaA* e *TspE4.C2*.....23
- Figura 2 - A) Desenho esquemático do SST3, representando a membrana interna e externa da bactéria com suas proteínas efetoras e a agulha surgindo da superfície da bactéria. B) SST3 em operação, translocando suas proteínas efetoras diretamente no citosol da célula hospedeira. C) Microscopia eletrônica da superfície da bactéria ilustrando as agulhas do SST3.27
- Figura 3 - Distribuição dos isolados de *E. coli* - MPEC e ambientais - em relação aos grupos genéticos A, B1, B2 e D. Obs: O número entre parênteses representa o número de isolados.....42
- Figura 4 - Amplificação dos produtos de PCR para isolados de MPEC. A) PCR específica para *E. coli*, tamanho do produto igual a 890pb. B) Amplificação do gene *escN*, tamanho do produto igual a 815pb. C) Amplificação do gene *lpfA*, tamanho do produto igual a 879pb. D) Amplificação do gene *fliC*, tamanho do produto igual a 146pb.....43
- Figura 5 - Distribuição individual dos genes de virulência em relação aos isolados de MPEC e de ambiente. Os genes de virulência *F17* e *icm* apresentaram valores iguais a zero.45

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Genes de virulência e condições de amplificação utilizadas. | 36 |
| Tabela 2 - Iniciadores utilizados, tamanho esperado dos produtos de amplificação e suas respectivas referências para detecção dos genes específicos e de virulência de <i>Escherichia coli</i> | 38 |
| Tabela 3 - Perfis gênicos de virulência encontrados em isolados de MPEC e ambientais em rebanhos bovinos leiteiros. | 44 |
| Tabela 4 - Perfis gênicos de virulência e classificação em relação ao grupo genético em isolados de MPEC e de ambiente. | 46 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| AIEC | <i>Escherichia coli</i> aderente invasiva |
| APEC | <i>Escherichia coli</i> patogênica aviária |
| CCS | Contagem de células somáticas |
| chuA | Classificação grupo genético |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeos |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EAEC | <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa |
| EHEC | <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica |
| EMB | Eosina azul de metileno |
| escN | Gene conservado da base do SST3 |
| ETEC | <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica |
| ExPEC | <i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal |
| F17 | Gene subunidade maior da pilina |
| fliC | Gene codificador da flagelina |
| Icm | Gene conservado do SST6 |
| KOH | Hidróxido de potássio |
| lpfA | Gene codificador da longa fímbria polar |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MgCl ₂ | Cloreto de magnésio |
| MPEC | <i>Escherichia coli</i> patogênica mamária |
| PCR | Reação em cadeia de polimerase |
| SST3 | Sistema de secreção do tipo III |
| SST6 | Sistema de secreção do tipo VI |
| TspE4.C2 | Classificação grupo genético |
| UPEC | <i>Escherichia coli</i> uropatogênica |
| yjaA | Classificação grupo genético |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 19 |
| 2.1 | Impactos econômicos da mastite bovina na produção leiteira | 19 |
| 2.2 | <i>Escherichia coli</i> | 22 |
| 2.3 | <i>Escherichia coli</i> e seus fatores de virulência..... | 24 |
| 2.3.1 | Adesão e colonização..... | 24 |
| 2.3.2 | Sistema de secreção | 26 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 31 |
| 3.1 | Objetivo geral..... | 31 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 31 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 4.1 | Bactérias utilizadas..... | 33 |
| 4.2 | Identificação bioquímica | 33 |
| 4.3 | Identificação molecular | 33 |
| 4.3.1 | Extração de DNA..... | 33 |
| 4.3.2 | PCR espécie-específica para <i>Escherichia coli</i> | 34 |
| 4.3.3 | Grupo genético | 34 |
| 4.3.4 | Genes de virulência..... | 36 |
| 4.4 | Eletroforese..... | 39 |
| 4.5 | Análise estatística..... | 39 |
| 5 | RESULTADOS | 41 |
| 5.1 | Caracterização morfológica e teste molecular específico | 41 |
| 5.2 | Grupo genético | 41 |
| 5.3 | Genes de virulência..... | 42 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 47 |
| 6.1 | Caracterização morfológica e teste molecular específico | 47 |
| 6.2 | Grupo genético | 47 |
| 6.3 | Genes de virulência..... | 49 |
| 7 | CONCLUSÕES..... | 55 |
| | REFERÊNCIAS..... | 57 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupou a quinta posição em termos de produção de leite, no ano de 2014, ficando atrás somente da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China, com produção estimada em 35,17 bilhões de litros de leite e média de 1.525 litros/vaca/ano, um aumento de 2,7% na produção quando comparado com o ano de 2013. O principal Estado produtor de leite foi Minas Gerais com 9,37 bilhões de litros, o que correspondeu a 77,0% da produção da Região Sudeste e a 26,6% da produção brasileira (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014).

O aumento expressivo na produção de leite, no Brasil, traz também preocupações, em relação às doenças que acometem os animais e interferem, negativamente, na qualidade da matéria-prima produzida e na produtividade dos rebanhos. A mastite destaca-se como umas das principais doenças do rebanho leiteiro, ocasionando perdas que correspondem a, aproximadamente, 38% dos custos totais associados às doenças em geral (BRADLEY, 2002; DOGAN et al., 2012).

A mastite bovina é considerada uma das mais importantes e onerosas doenças infecciosas da indústria leiteira, afetando a saúde animal, assim como a saúde pública, sendo problema potencial no consumo de leite não tratado ou inadequadamente tratado (DOGAN et al., 2012).

Os agentes etiológicos causadores de mastite em bovinos são classificados em dois grandes grupos: contagiosos e ambientais. Os primeiros são bem adaptados à glândula mamária e são transmitidos animal a animal, principalmente, via mãos de ordenhador e/ou equipamento de ordenha. São representados, sobretudo, por *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* (ZADOKS et al., 2011). Os patógenos ambientais são considerados agentes oportunistas, comumente encontrados no ambiente (BRADLEY et al., 2002). Dentro deste grupo, encontra-se *Escherichia coli*, que pode causar mastite

transitória e rápida, ou recorrente com episódios de infecções e cura alternados. Pode, ainda, causar infecção persistente com episódios de mastite clínica e subclínica alternados (ZADOKS et al., 2011). *E. coli* destaca-se como o principal agente causador da infecção intramamária, em rebanhos leiteiros, associado a sinais clínicos severos e está entre os agentes etiológicos mais isolados em mastite clínica com 13,51%, em estudo realizado, no município de Viçosa, em Minas Gerais (CUNHA et al., 2015; LIU et al., 2014).

Com o desenvolvimento de novas técnicas para tipagem de isolados de *E. coli*, essa bactéria pôde ser agrupada em vários patótipos, de acordo com seus mecanismos de virulência, incluindo *E. coli* patogênica mamária (MPEC) (SHPIGEL; ELAZAR; ROSENSHINE, 2008). Diversos fatores de virulência são utilizados pelo patógeno, para sua colonização, multiplicação e disseminação no hospedeiro. Em MPEC, os principais, descritos na literatura, têm sido os genes *lpfA*, *lcmF3*, *flic*, *F17* (BLUM et al., 2013; DEGO; OLIVER; ALMEIDA, 2012). Além disso, os patótipos de *E. coli* utilizam os Sistema de Secreção do Tipo III (SST3) e VI (SST6) para translocar suas proteínas efetoras e toxinas diretamente na célula do hospedeiro e causar os mais diversos danos.

Os resultados desta pesquisa poderão contribuir com o melhor entendimento da epidemiologia das infecções intramamárias, causadas pela bactéria *E. coli*, patógeno comumente isolado de casos de mastite clínica, sobretudo, em rebanhos intensivamente manejados. Também poderão contribuir para a identificação de potenciais marcadores fenotípicos e ou genotípicos que possam ser utilizados na identificação de isolados realmente associados à mastite bovina, já que até o momento não se tem conhecimento da identificação dos fatores de virulência dominantes para este patótipo. Além disso, a elucidação dos mecanismos utilizados pelas bactérias, para a secreção de proteínas, é de grande importância para a compreensão da associação entre patógeno e

hospedeiro, já que muitas das proteínas secretadas estão associadas à virulência da bactéria.

Deve-se ressaltar que a UFLA está localizada, em uma importante bacia leiteira, no Sul de Minas Gerais e presta serviços a produtores de leite e laticínios da região, principalmente, nas áreas de controle de mastite e de qualidade do leite, nas quais os conhecimentos gerados com a execução do projeto serão de grande aplicabilidade.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar os grupos genéticos de *E. coli* isolado de mastite bovina, detectar os genes de virulência de maior importância para MPEC e comparar os resultados dos isolados de mastite bovina e de ambiente, visando a subsidiar novas ferramentas de controle e prevenção da mastite bovina ambiental.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Impactos econômicos da mastite bovina na produção leiteira

A mastite bovina é considerada um dos principais fatores de risco, para o sistema de produção leiteiro, sendo responsável até 38% do total dos custos diretos das doenças comuns de produção, apesar das diversas pesquisas e medidas preventivas estabelecidas (BRADLEY, 2002; KEEFE et al., 2012; LE MARÉCHAL et al., 2011; NOTEBAERT; MEYER, 2006). As perdas econômicas estão relacionadas diretamente com a queda temporária ou permanente, na produção e qualidade do leite, redução no preço em virtude da alta contagem de células somáticas (CCS), descarte do leite, redução na vida produtiva, custos com tratamento e mão de obra, além de prejudicar o processamento de leite industrial pela baixa qualidade da matéria-prima (BLUM et al., 2015; HILLERTON; BERRY, 2005; VIGUIER et al., 2009). Além das implicações mencionadas, há também a grande preocupação com a saúde pública, decorrente da veiculação de agentes com potencial patogênico, para os seres humanos e do amplo uso de antibióticos, no tratamento e no controle da mastite, que pode resultar, em um aumento do risco de cepas resistentes aos antibióticos, que podem entrar na cadeia alimentar (BRADLEY, 2002).

A palavra mastite deriva do grego (*masto* – glândula mamária / *itis* – inflamação) sendo considerada uma reação inflamatória na glândula mamária (KULKARNI; KALIWAL, 2013; NOTEBAERT; MEYER, 2006). De forma geral, o termo mastite pode ser utilizado, para descrever qualquer injúria, que resulte em uma inflamação da glândula mamária, tendo como causa principal os microrganismos patogênicos presentes no ambiente e pele dos animais que conseguem entrar no canal do teto (BLUM et al., 2015; KULKARNI; KALIWAL, 2013).

Em condições normais, o canal do teto é hermeticamente fechado pelos músculos do esfíncter e coberto por uma camada de queratina, produzida pelo epitélio escamoso estratificado que previne a invasão da glândula mamária. Entretanto a eficiência da queratina é restrita. No período peri-parto, ocorre um acúmulo de líquido dentro da glândula mamária e aumento da pressão intramamária, o que a torna vulnerável pela dilatação do canal do teto e vazamento de secreções. Adicionalmente, a camada de queratina é removida durante a lactação e ocorre a distensão do canal do teto. Para que o esfíncter se contraia novamente, são necessárias, aproximadamente, duas horas (VIGUIER et al., 2009).

A inflamação é resultado, principalmente, da invasão microbiana da glândula mamária. Após a entrada no teto (considerando uma infecção bacteriana), a bactéria estimula o sistema imune humoral e celular do bovino. Caso o hospedeiro não consiga eliminar o patógeno, ocorrerá a multiplicação na glândula mamária com liberação de toxinas e novo estímulo às células imunes efectoras. Destas, as principais atraídas ao sítio de infecção serão neutrófilos polimorfonucleares, os quais fagocitam e podem destruir a bactéria. Em consequência da reação inflamatória, o tecido secretor pode ser lesionado, o que causará uma queda na produção do leite. A maioria dos neutrófilos polimorfonucleares sofre apoptose e será secretado no leite juntamente com as células epiteliais mamárias, resultando em alta contagem de células somáticas (RAINARD; RIOLLET, 2006; VIGUIER et al., 2009).

A inflamação será classificada, de acordo com a severidade, como subclínica, clínica e crônica; e esta dependerá da natureza do agente etiológico e de fatores relacionados com o hospedeiro, como idade, raça, estado imunológico e fase de lactação. As bactérias são os principais agentes causadores de mastite, mas vírus, algas e fungos também podem ocasionar a inflamação (KULKARNI; KALIWAL, 2013; NOTEBAERT; MEYER, 2006; PYORALA, 2003). No caso

das bactérias, o estabelecimento e a severidade da doença podem ser influenciados pela expressão dos genes de virulência (AITKEN; CORL; SORDILLO, 2011).

A mastite clínica é caracterizada por um início súbito, úbere avermelhado, inchado, dor, alteração na secreção do leite nos quartos afetados. O leite pode apresentar coágulos visíveis, podendo ocorrer febre, depressão e anorexia (KULKARNI; KALIWAL, 2013).

Ao contrário da mastite clínica, a subclínica é de difícil detecção, não havendo sinais visíveis, no úbere ou no leite, porém há redução na produção de leite e aumento da CCS (KULKARNI; KALIWAL, 2013). A forma crônica resulta de infecção persistente da glândula mamária, ocasionando lesões permanentes no parênquima mamário (VIGUIER et al., 2009).

A mastite pode ser causada por fatores físicos, químicos ou biológicos (microrganismos). No caso de microrganismos, eles podem ser classificados, de acordo com o reservatório primário e o modo de transmissão em patógenos contagiosos e ambientais (GOMES; HENRIQUES, 2016). Os microrganismos contagiosos, frequentemente, estão presentes no úbere ou na superfície do teto de um animal infectado e podem infectar os demais quartos do úbere do próprio animal e infectar, também, outros animais, principalmente, no momento da ordenha. Como exemplo de microrganismos contagiosos, têm-se o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*. Os microrganismos ambientais são aqueles presentes em fezes, solo, água e estalagem dos bovinos, os mais comuns são *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* (KULKARNI; KALIWAL, 2013; TALBOT; LACASSE, 2005).

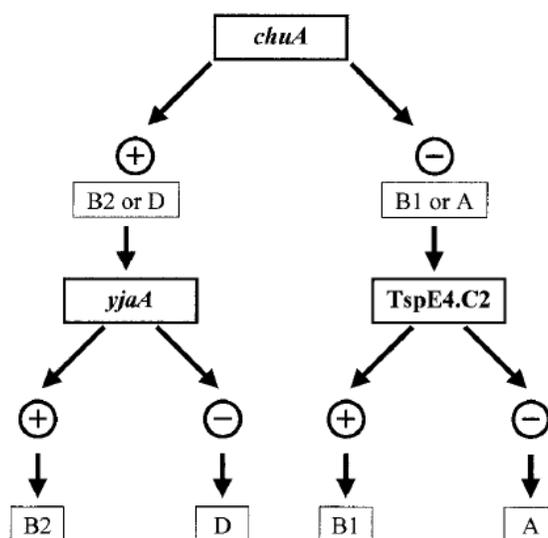
2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli apresenta-se, na forma de bastonetes gram-negativos, não formadores de esporos. São bactérias anaeróbicas facultativas, fermentadoras de lactose, oxidase e catalase-negativas, nitrato-redutase positivas, pertencentes à família Enterobacteriaceae e ao gênero *Escherichia*. Apresentam-se como bastonetes com extremidades arredondadas, medindo em torno de 1,1 a 1,5 µm de diâmetro e 2,0 a 6,0 µm de comprimento, apresentando-se individualmente ou em pares e podendo ser móveis ou imóveis dependendo da presença de flagelos (MALUTA, 2012).

Escherichia coli coloniza o sistema gastrointestinal de humanos de forma comensal, logo nas primeiras horas de vida, porém existem cepas que, por adquirem fatores de virulência específicos que permitem sua adaptação a outros nichos, causam diversos tipos de doenças (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005).

Escherichia coli é classificada, de acordo com seus grupos genéticos, podendo ser categorizada como grupo A, B1, B2 e D, dependendo da presença ou não dos genes *chuA*, *yjaA* e *TspE4.C2* (Figura 1) (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; LIU et al., 2014). O grupo genético parece ter associação com o nicho ecológico do hospedeiro, tipo de doença causada pelo isolado e aos fatores de virulência que o isolado possui, porém a correlação entre os grupos genéticos e MPEC, ainda, não foi bem estabelecida (LIU et al., 2014).

Figura 1 - Árvore decisória para determinação do grupo genético de isolados de *E. coli* utilizando os resultados das ampliações da PCR dos genes *chuA*, *yjaA* e *TspE4.C2*.



Fonte: Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000).

Em relação a sua diversidade, *E. coli* pode ser classificada em diferentes patótipos, dentre eles: *E. coli* aderente invasiva (AIEC), *E. coli* patogênica aviária (APEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) e *E. coli* uropatogênica (UPEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). *E. coli*, também, é um patógeno frequentemente associado com a mastite bovina e pela sua importância, tem sido proposto um novo patótipo, denominado *E. coli* patogênica mamária (MPEC) (BLUM et al., 2015; LIU et al., 2014; SHPIGEL; ELAZAR; ROSENSHINE, 2008).

Escherichia coli é uma bactéria ambiental que pode causar infecção transitória com mastite severa, assim como mastite branda e crônica com

infecção persistente, tornando-se grande problema, em rebanhos leiteiros bem gerenciados, que reduziram a prevalência dos patógenos contagiosos (ALMEIDA et al., 2011; DOGAN et al., 2012).

A mastite causada por *E. coli* pode variar de leve, autolimitante até uma condição de sepsis fatal, sendo normalmente associada com sinais clínicos severos (LIU et al., 2014; SHPIGEL; ELAZAR; ROSENSHINE, 2008). Episódios recorrentes de mastite por infecções persistentes de *E. coli*, em animais, também, têm sido relatados, podendo representar, aproximadamente, 4,8% dos casos clínicos (BLUM et al., 2015).

As cepas patogênicas de *E. coli* utilizam várias estratégias de patogênese similares a outros patógenos de mucosas, consistindo da colonização da mucosa local, evasão da defesa do hospedeiro, multiplicação e danos teciduais por meio de seus fatores de virulência como as adesinas, invasinas, produção de cápsula, liberação de proteínas efetoras e toxinas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

2.3 *Escherichia coli* e seus fatores de virulência

Os mecanismos de patogenicidade de *E. coli* envolvem grande número de fatores de virulência diferentes entre cada grupo de *E. coli*. Estes fatores são capazes de modificar a superfície celular, liberar toxinas, invasinas e translocar proteínas efetoras por sistemas de secreção (BLUM; LEITNER, 2013; KYAW et al., 2003).

2.3.1 Adesão e colonização

Escherichia coli patogênica possui fatores de virulência específicos responsáveis por sua colonização em diversos sítios corporais. As adesinas, fator importante para adesão da bactéria às mucosas, formam distintas estruturas chamadas de fímbrias ou pili. Estas estruturas têm de 5 a 10 nm de diâmetro e podem incluir proteínas da membrana externa como a intimina, responsável por mediar a ligação de *E. coli* enteropatogênica com as células epiteliais e estimular

a resposta imune do hospedeiro, ou outras proteínas não fimbriais e sua expressão é influenciada pelas condições de temperatura, pH e osmolaridade do meio (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Dentre as adesinas de importância, para colonização da glândula mamária, estão as fimbrias F17 associadas com a mastite em bovinos e diarreia e septicemias em ovinos (CID et al., 1999; FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005). As fimbrias da família F17, também, estão relacionadas às doenças intestinal e extraintestinal tanto em humanos quanto em animais, sendo compostas por duas principais proteínas, um componente fimbrial estrutural e um receptor de reconhecimento da adesina. *E. coli* produtora de F17 tem sido relacionada com doenças extraintestinais e, frequentemente, apresenta fatores de virulência associados com a habilidade de causar septicemia tais como, resistência ao soro e produção de aerobactina (CID et al., 1999).

Outro gene codificador de adesinas fimbriais é o *lpfA*, codificador da longa fimbria polar, associada à capacidade de invadir células epiteliais mamárias bovinas (BLUM; LEITNER, 2013; DOGAN et al., 2012). Esse gene foi, primeiramente identificado, em *Salmonella* Typhimurium e depois, em diferentes patótipos de *E. coli* enteropatogênica e cepas não patogênicas. O *lpfA* é conhecido por mediar a adesão epitelial à glândula mamária (BLUM; LEITNER, 2013).

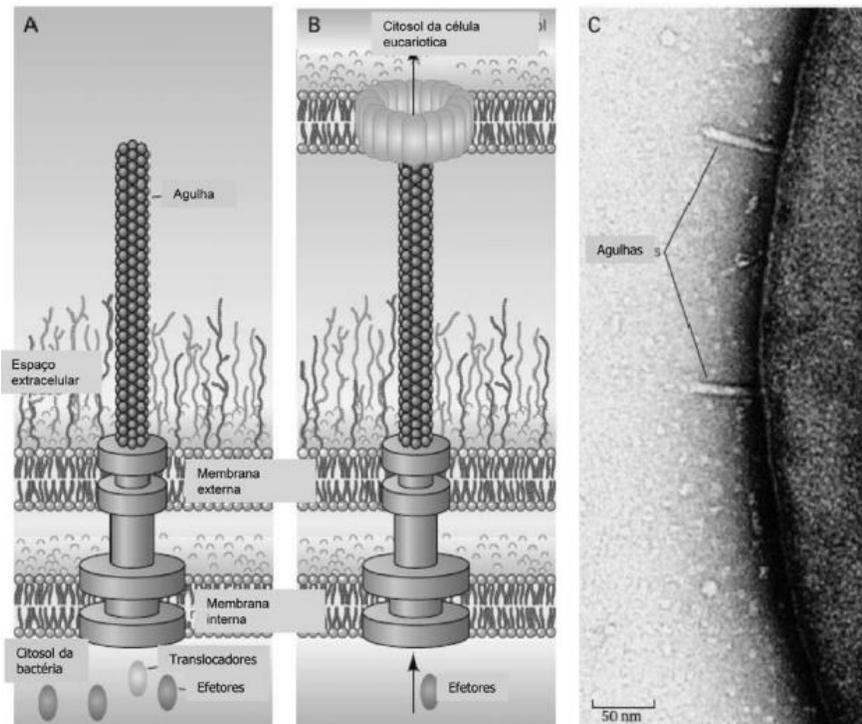
O lipopolissacarídeo (LPS) pode desencadear cascata de citocinas que podem levar o hospedeiro ao choque séptico e à morte. Também há a flagelina, principal componente dos flagelos, capaz de ativar a interleucina e promover resposta inflamatória. O gene codificador da flagelina é denominado *fliC* (CUNHA et al., 2015; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

2.3.2 Sistema de secreção

As bactérias formam imensa diversidade de associações bióticas e a secreção proteica possui papel importante nestas associações. Existem, até o momento, seis sistemas de secreção descritos na literatura, para as bactérias gram-negativas, cujo conhecimento é de grande importância, pois possuem papel na virulência bacteriana e adaptação da bactéria ao ambiente. Os sistemas de secreção vão de I ao VI e os tipos II e V são responsáveis por secretar proteínas bacterianas ao meio extracelular, enquanto os sistemas de secreção do tipo I, III, IV, VI secretam as proteínas bacterianas por meio das membranas interna e externa de uma só vez, destacando-se os tipos III, IV e VI que são capazes de translocar proteínas bacterianas diretamente para o citosol da célula eucariótica (BÜTTNER, 2012; MARLOVITS; STEBBINS, 2010).

Várias bactérias gram-negativas possuem o Sistema de Secreção do Tipo III (SST3) como um dos principais fatores de virulência, apresentando-se na forma de estrutura complexa com mais de 20 proteínas formando uma “seringa e agulha” que permite que proteínas efetoras sejam translocadas diretamente no interior da célula hospedeira (Figura 2) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Figura 2 - A) Desenho esquemático do SST3, representando a membrana interna e externa da bactéria com suas proteínas efetoras e a agulha surgindo da superfície da bactéria. B) SST3 em operação, translocando suas proteínas efetoras diretamente no citosol da célula hospedeira. C) Microscopia eletrônica da superfície da bactéria ilustrando as agulhas do SST3.



Fonte: Vieira (2009).

A seringa é composta por vários anéis basais que abrangem as membranas internas e externas ligadas à agulha. A agulha é inserida na membrana plasmática da célula alvo para translocação de proteínas efetoras. A ATPase conservada associa-se com a base citoplasmática bacteriana da seringa e é responsável pelo fornecimento de energia para o transporte enquanto duas classes de chaperonas auxiliam na montagem da agulha e uma terceira classe auxilia na translocação de proteínas efetoras. As proteínas efetoras modulam

funções bioquímicas do hospedeiro, como exemplo, a estrutura do citoesqueleto, morte celular programada, progressão do ciclo celular, tráfego endocítico e a expressão gênica (BÜTTNER, 2012; MARLOVITS; STEBBINS, 2010). O gene *escN* está presente na base do SST3 sendo considerado um gene conservado deste sistema e responsável pela regulação da ATPase.

O Sistema de Secreção do Tipo VI (SST6), também, vem sendo estudado e se mostra de importância para a virulência de *E. coli*. O SST6 foi nomeado apenas em 2006, porém a sua existência já era cogitada, há cerca de uma década (BINGLE; BAILEY; PALLEN, 2008), mas pouco se sabe sobre a topologia e a estrutura das subunidades do SST6 e a distinção entre genes que codificam suas subunidades e as proteínas reguladoras (MA; LIN; LAI, 2009).

Um estudo recente demonstrou que isolados de MPEC possuem o SST6 enquanto os isolados comensais apresentam-no ocasionalmente. Portanto pode ser que SST6 esteja associado à patogênese de isolados de MPEC e/ou como atributo competitivo entre bactérias. Isso se torna importante para o desenvolvimento de inibidores específicos de MPEC (RICHARDS et al., 2015). Esse fator de virulência tem se mostrado de grande importância para APEC, com descrição de três regiões de SST6 nas cepas de APEC (MA et al., 2013).

O SST6 apresenta um operon composto por 15 a 20 genes, no qual foi identificado um grupo de 13 proteínas conservadas que constituem o núcleo do SST6 e um conjunto de proteínas não conservadas que são responsáveis por funções regulatórias e acessórias (BINGLE; BAILEY; PALLEN, 2008; SHRIVASTAVA; MANDE, 2008).

Alguns genes que compõem o SST6 foram caracterizados parcialmente, sendo eles o *clpV*, *hcp*, *vgrG* – codificadores de proteínas estruturais e secretadas – e um conjunto de genes homólogos ao *icmF* de *Legionella pneumophila* - componente essencial deste sistema - o qual parece ter papel importante, na estabilização do complexo do SST6 e essencial, para a replicação intracelular,

em várias linhagens bacterianas (BINGLE; BAILEY; PALLAN, 2008; CASCALES, 2008; MA; LIN; LAI, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente amostras de *E. coli* isoladas de infecções intramamárias de bovinos e do ambiente.

3.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar os grupos genéticos amostras de *E. coli* isoladas de infecções intramamárias de bovinos e do ambiente;
- b) Pesquisar a presença dos genes de virulência *fliC*, *escN*, *lpfA*, *f17*, *icm* em amostras de *E. coli* isoladas de infecções intramamárias de bovinos e do ambiente;
- c) Comparar a frequência dos genes de virulência *fliC*, *escN*, *lpfA*, *f17*, *icm* em amostras de *E. coli* isoladas de infecções intramamárias de bovinos e do ambiente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bactérias utilizadas

Um total de 100 isolados de *E. coli* foram utilizados, sendo 69 isolados provenientes de amostras de mastite bovina e 31 isolados do ambiente dos animais (amostras de fezes de rebanhos leiteiros), enviado para diagnóstico, no laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva no período de 2005 até 2017. As bactérias isoladas foram congeladas a -70°C em caldo BHI suplementado com 10% de glicerol até o uso.

4.2 Identificação bioquímica

Todas as amostras foram identificadas, fenotipicamente, por avaliação morfológica das colônias em ágar EMB (*Eosin Methylene Blue Agar*), KOH a 3% (hidróxido de potássio), coloração de Gram e identificadas, bioquimicamente, utilizando os kits Bactray I e II. Os isolados identificados, fenotipicamente como *E. coli*, foram submetidos a testes moleculares, visando à identificação genotípica, por meio de PCR específica, utilizando-se a metodologia proposta por Chen e Griffiths (1998).

4.3 Identificação molecular

Os testes moleculares realizados para análise das amostras estão descritos nos itens seguintes.

4.3.1 Extração de DNA

Os isolados de *E. coli* foram cultivados em ágar tripticaseína soja (Himedia®, Índia) a 37°C durante 24 horas. Após esse período, uma colônia foi repicada, em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Sigma-Aldrich®, Índia), a 37°C por 24 horas, para que a extração do DNA genômico fosse procedida, de acordo com o protocolo padrão, para extração de bactérias Gram-negativas, do kit Wizard® Genomic DNA Purification Axygen (Promega®, Estados Unidos).

A análise do DNA extraído foi realizada com aparelho específico (NanoVue™ Plus Spectrophotometer), para determinação da pureza e concentração final e, por meio da eletroforese em gel de agarose, para verificação da integridade.

4.3.2 PCR espécie-específica para *Escherichia coli*

A diferenciação da bactéria *E. coli* de outras bactérias gram-negativas foi avaliada por PCR individual, em termociclador Peltier Thermal Cycler Multi-Purpose (Biocycle®, China), utilizando iniciadores previamente descritos na literatura (Tabela 2).

Para o preparo do mix, foi utilizado o kit PCR Master Mix (Promega®, Estados Unidos) com a seguinte formulação: 14,95µl de água ultrapura, 5µl de tampão, 1,5µl de MgCl₂, 0,25µl de dNTP, 0,5µl de cada primer, 0,3µl de TaqPolimerase e 2µl de DNA.

A amplificação foi realizada conforme Chen e Griffiths (1998) com modificações, sendo utilizado um aquecimento inicial de 95°C por 5 minutos, amplificação de 35 ciclos, consistindo em 95°C por 1 minuto, 66,4°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose conforme descrito no item 4.4.

Para avaliar a reprodutibilidade dos ensaios de PCR, as amostras foram submetidas a retestes em cada bateria de testes. A avaliação da especificidade das reações foi realizada, por meio da análise do tamanho dos produtos de amplificação formados e pela presença de banda única na eletroforese.

4.3.3 Grupo genético

A classificação dos isolados, em relação aos grupos genéticos, foi avaliada por PCR individual, em termociclador Peltier Thermal Cycler Multi-

Purpose (Biocycle®, China), utilizando iniciadores previamente descritos na literatura (Tabela 2).

Foi realizada a PCR convencional, conforme árvore decisória para determinação do grupo genético de isolados de *E. coli*, utilizando-se os resultados das amplificações da PCR dos genes *chua*, *yjaA* e *TspE4.C2* (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000).

O *mix*, para realização da PCR para todos os três genes, foi preparado utilizando-se o kit PCR Master Mix (Promega®, Estados Unidos) com a seguinte formulação: 10,6µl de água ultrapura, 5µl de tampão, 1,5µl de MgCl₂, 0,5µl de dNTP, 01,0µl de cada primer, 0,4µl de TaqPolimerase e 5µl de DNA.

A amplificação foi realizada conforme Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) com modificações. Para o gene *chuA* e *yjaA*, foi utilizado um aquecimento inicial de 94°C, por 5 minutos, amplificação de 35 ciclos, consistindo em 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Para o gene *TspE4.C2*, foi utilizado um aquecimento inicial de 94°C por 5 minutos, amplificação de 35 ciclos, consistindo em 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Inicialmente, foi realizada a PCR para o gene *chuA*. Os isolados positivos foram testados para o gene *yjaA*; se positivos, eram classificados como pertencentes ao grupo B2; se negativos, pertencentes ao grupo D. Os isolados negativos para o gene *chuA* foram testados, para o gene *TspE4.C2*, sendo os isolados positivos classificados como pertencentes ao grupo B1 e os negativos pertencentes ao grupo A (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000).

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose conforme descrito no item 4.4.

Para avaliar a reprodutibilidade dos ensaios de PCR, as amostras foram submetidas a retestes em cada bateria de testes. A avaliação da especificidade

das reações foi realizada, pela análise do tamanho dos produtos de amplificação formados e pela presença de banda única na eletroforese.

4.3.4 Genes de virulência

A presença dos genes de virulência foi avaliada, por meio da realização de PCR individual, em termociclador Peltier Thermal Cycler Multi-Purpose (Biocycle®, China), com condições de amplificação otimizadas (Tabela 1) e utilizando iniciadores previamente descritos na literatura (Tabela 2).

Tabela 1 - Genes de virulência e condições de amplificação utilizadas.

(Continua)

| Gene de Virulência | Condições de Amplificação Reações de 25µl |
|--------------------|--|
| fliC | Água ultrapura: 15,95µl, 5µl de tampão, 0,5µl de MgCl ₂ , 0,25µl de dNTP, 0,5µl de cada primer, 0,3µl de TaqPolimerase e 2µl de DNA. A amplificação foi realizada, conforme Dego, Oliver e Almeida (2012) com modificações, sendo utilizado um aquecimento inicial de 95°C por 5 minutos, amplificação de 40 ciclos, consistindo em 95°C por 30 segundos, 58,6°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. |
| escN | Água ultrapura 10,6µl, 5µl de tampão, 1,5µl de MgCl ₂ , 0,5µl de dNTP, 1µl de cada primer, 0,4µl de TaqPolimerase e 5µl de DNA. A amplificação foi realizada, conforme Kyaw et al. (2003) com modificações, sendo utilizado um aquecimento inicial de 95°C por 1 minuto, amplificação de 35 ciclos, consistindo em 93°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. |
| lpfA | Água ultrapura: 14,95µl, 5µl de tampão, 1,5µl de MgCl ₂ , 0,25µl de dNTP, 0,5µl de cada primer, 0,3µl de TaqPolimerase e 2µl de DNA. A amplificação foi realizada, conforme Blum e Leitner (2013) com modificações, sendo utilizado um aquecimento inicial de 95°C por 5 minutos, amplificação de 35 ciclos, consistindo em 95°C por 1 minuto, 70°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. |

Tabela 1 - Genes de virulência e condições de amplificação utilizadas.

(Conclusão)

| Gene de Virulência | Condições de Amplificação Reações de 25µl |
|--------------------|--|
| F17 | Água ultrapura: 14,95µl, 5µl de tampão, 1,5µl de MgCl ₂ , 0,25µl de dNTP, 0,5µl de cada primer, 0,3µl de TaqPolimerase e 2µl de DNA. A amplificação foi realizada, conforme Blum e Leitner (2013) com modificações, sendo utilizado um aquecimento inicial de 95°C por 5 minutos, amplificação de 35 ciclos, consistindo em 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. |
| icm | Água ultrapura: 14,95µl, 5µl de tampão, 1,5µl de MgCl ₂ , 0,25µl de dNTP, 0,5µl de cada primer, 0,3µl de TaqPolimerase e 2µl de DNA. A amplificação foi realizada, conforme Ma et al. (2013) com modificações, sendo utilizado um aquecimento inicial de 95°C por 5 minutos, amplificação de 35 ciclos, consistindo em 95°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. |

Fonte: Elaborado pela autora (2016)

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose conforme descrito no item 4.4.

Para avaliar a reprodutibilidade dos ensaios de PCR, as amostras foram submetidas a retestes em cada bateria de testes. A avaliação da especificidade das reações foi realizada por meio da análise do tamanho dos produtos de amplificação formados e pela presença banda única na eletroforese.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados, tamanho esperado dos produtos de amplificação e suas respectivas referências para detecção dos genes específicos e de virulência de *Escherichia coli*.

| Primer | Especificação | Sequência 5'-3' | Tamanho do Produto | Referência |
|-------------------|----------------------------------|------------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| EC1 | <i>E. coli</i> específica | 5'CCGATACGCTGCCAATCAGT | 890 pb | Chen e Griffiths (1998) |
| EC2 | <i>E. coli</i> específica | 5'ACGCAGACCGTAGGCCAGAT | | |
| chuA1 | Classificação grupo filogenético | 5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3' | 279 pb | Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) |
| chuA2 | | 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3' | | |
| yjaA1 | Classificação grupo genético | 5'-TGAAGTGTGAGGAGACGCTG-3' | 211 pb | Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) |
| yjaA2 | | 5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3' | | |
| TspE4.C2 1 | Classificação grupo genético | 5'-GAGTAATGTGCGGGGCATTCA-3' | 152 pb | Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) |
| TspE4.C2 2 | | 5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3' | | |
| lpfAF | Fímbria polar longa | 5' GGACATCCTGTTACAGCGCGCA 3' | 879 pb | Blum e Leitner (2013) |
| lpfAR | | 5' TCGCCACCAATCACAGCCGAAC 3' | | |
| fliCF | Flagelina | 5' CCGGTGGTGATAACGATGGG 3' | 146 pb | Dego, Oliver e Almeida (2012) |
| fliCR | | 5' CAGGTGTACCGCCTGAAGTG 3' | | |
| F17F | Subunidade maior da pilina | 5' TATCCTTGGAATACTGGCGG 3' | 254pb | Cid et al. (1999) |
| F17R | | 5' CCAGTGGTGTAATCCGTGTT 3' | | |
| icmF | SST6 | 5'AGAAACCTCCTGACTGAGTTGG 3' | 495 pb | Ma et al. (2013) |
| icmE | | 5'TTTCATTCCGTTATCCACTTTAAG3' | | |
| escNF | SST3 | 5'CGCCTTTTACAAGATAGAAC3' | 815 pb | Kyaw et al. (2003) |
| escNR | | 5'CATCAAGAATAGAGCGGAC3' | | |

Fonte: Elaborado pela autora (2016)

4.4 Eletroforese

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,2% a 2,0% (Invitrogen Brasil, São Paulo), corados com 0,5x Gelred™ (Biotium®, Hayward, CA), utilizando-se tampão de corrida TAE 1X (Tris-Acetate, 0,04 M; EDTA, 0,001 M). As imagens foram reveladas e registradas em aparelho transluminador (L-Pix Chemi Photo Digitizer - Loccus Biotecnologia, Brasil) para serem analisadas. Foram utilizados marcadores de tamanho molecular de 100 pb e 1kb (New England Biolabs®Inc).

4.5 Análise estatística

A análise estatística, para comparação das características avaliadas, foi realizada, utilizando o teste Qui Quadrado e o teste exato de Fisher (EPIINFO 7), sendo considerados, estatisticamente significativos, resultados com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização morfológica e teste molecular específico

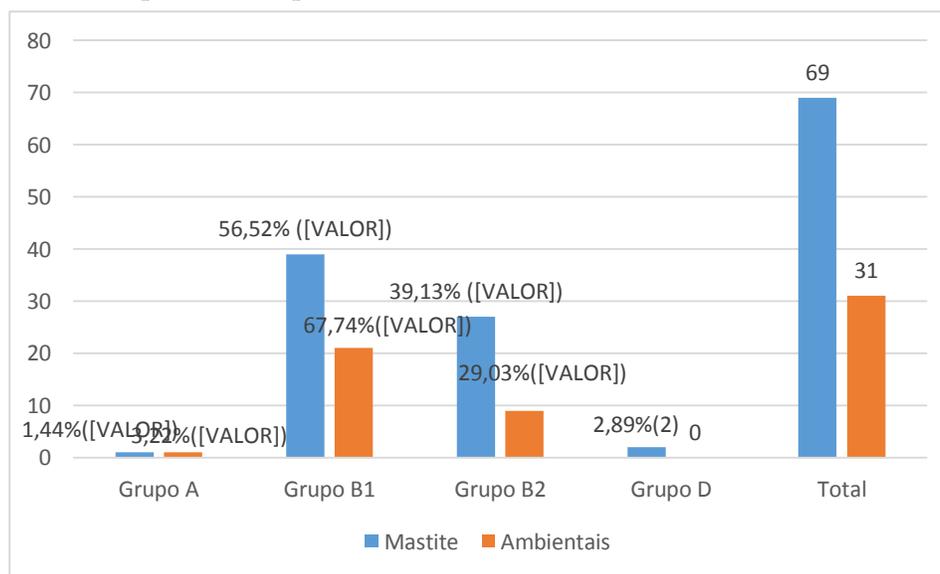
Entre as 100 amostras de bactérias estudadas, um total de 67 (97,10%) isolados de MPEC e 28 (90,32%) de ambiente tiveram resultado sugestivo para *E. coli* em meio EMB (apresentação de coloração verde brilhante). Todos os 100 isolados foram caracterizados como *E. coli*, frente ao teste KOH a 3%, coloração Gram, Bactray I e II e por meio da PCR espécie-específica para *E. coli* (Figura 4A).

5.2 Grupo genético

O grupo genético B1 foi o mais frequente dentre os demais com 56,52% (n= 39) dos isolados de MPEC, seguido do grupo B2 com 39,13% (n= 27), grupo D com 2,89% (n=2) e, por último, o grupo A com 1,44% (n=1) (Figura 3).

Quanto aos isolados de ambiente, 21 (67,74%) foram classificados dentro do grupo genético B1, nove (29,03%) no grupo B2 e um (3,22%) isolado no grupo A (Figura 3). Não foram encontrados isolados pertencentes ao grupo D nas amostras de fezes.

Figura 3 - Distribuição dos isolados de *E. coli* - MPEC e ambientais - em relação aos grupos genéticos A, B1, B2 e D. Obs: O número entre parênteses representa o número de isolados.

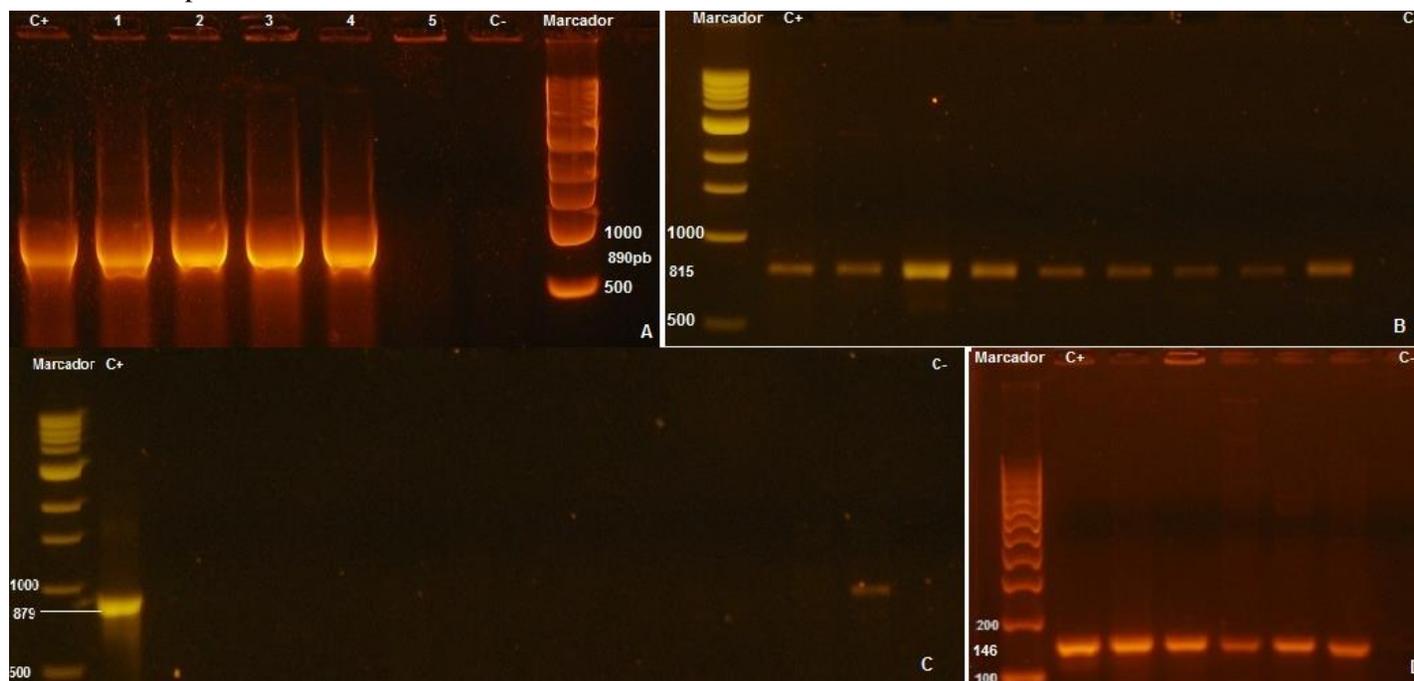


Fonte: Elaborado pela autora, dados do experimento (2016)

5.3 Genes de virulência

Os testes moleculares (Figura 4) demonstraram a ocorrência de oito perfis de virulência nos isolados estudados (Tabela 3). Em relação ao grupo de MPEC, o perfil 5 foi o mais frequente com 27 isolados (39,13%), seguido dos perfis 3 com 14 isolados (20,28%) e 4 com 10 isolados (14,49%), cujas frequências diferiram significativamente. A frequência do perfil 1 (n=6) não teve diferença significativa dos perfis 8 (n=6), perfil 6 (n=4) e dos perfis 2 e 7 (n=1) ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Figura 4 - Amplificação dos produtos de PCR para isolados de MPEC. A) PCR específica para *E. coli*, tamanho do produto igual a 890pb. B) Amplificação do gene *escN*, tamanho do produto igual a 815pb. C) Amplificação do gene *lpfA*, tamanho do produto igual a 879pb. D) Amplificação do gene *fliC*, tamanho do produto igual a 146pb.



Obs.: C+ controle positivo; C- controle negativo.

Fonte: Elaborado pela autora, dados do experimento (2016)

Tabela 3 - Perfis gênicos de virulência encontrados em isolados de MPEC e ambientais em rebanhos bovinos leiteiros.

| Perfil/Gene* | <i>lpfA</i> | <i>fliC</i> | <i>escN</i> | Isolados MPEC | Isolados de Ambiente** |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|-------------------------------|
| Perfil 1 | + | + | - | 6 (8,69%) | 0 (0%) |
| Perfil 2 | + | - | - | 1 (1,44%) | 0 (0%) |
| Perfil 3 | - | + | - | 14 (20,28%) | 0 (0%) |
| Perfil 4 | - | - | - | 10 (14,49%) | 0 (0%) |
| Perfil 5 | - | + | + | 27 (39,13%) | 6 (19,35%) |
| Perfil 6 | + | + | + | 4 (5,79%) | 5 (16,12%) |
| Perfil 7 | + | - | + | 1 (1,44%) | 13 (41,93%) |
| Perfil 8 | - | - | + | 6 (8,69%) | 7 (22,58%) |

Fonte: Elaborado pela autora, dados do experimento (2016)

*Não foram encontrados os genes de virulência *F17* e *icm*.

**Não foram observados os perfis 1, 2, 3 e 4 nas amostras de ambientes.

Figura 5 - Distribuição individual dos genes de virulência em relação aos isolados de MPEC e de ambiente. Os genes de virulência *F17* e *icm* apresentaram valores iguais a zero.



Fonte: Elaborado pela autora, dados do experimento (2016)

Tabela 4 - Perfis gênicos de virulência e classificação em relação ao grupo genético em isolados de MPEC e de ambiente.

45

| Perfil/Grupo* | B1 | | B2 | | A | | D | |
|-----------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|-----------------------|
| | Mastite | Ambiente | Mastite | Ambiente | Mastite | Ambiente | Mastite | Ambiente ¹ |
| Perfil 1 | 1 | - | 5 | - | - | - | - | - |
| Perfil 2 | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| Perfil 3 | 13 | - | 1 | - | - | - | - | - |
| Perfil 4 | 7 | - | 1 | - | 1 | - | 1 | - |
| Perfil 5 | 17 | 3 | 10 | 3 | - | - | - | - |
| Perfil 6 | 1 | 2 | 3 | 3 | - | - | - | - |
| Perfil 7 | - | 10 | 1 | 2 | - | 1 | - | - |
| Perfil 8 | - | 6 | 5 | 1 | - | - | 1 | - |
| Total | 39 | 21 | 27 | 9 | 1 | 1 | 2 | - |

Fonte: Elaborado pela autora, dados do experimento (2016)

*Não houve diferença significativa quanto à distribuição dos grupos genéticos nos perfis de virulência e em relação à origem dos isolados (MPEC ou ambiente) ($p>0,05$).

¹Não foi encontrado nenhum isolado pertencente ao grupo D nos isolados de ambiente (fezes).

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização morfológica e teste molecular específico

O ágar EMB é um meio seletivo/indicador utilizado para isolamento e diferenciação de bacilos entéricos gram-negativos. Os coliformes apresentam-se como colônias pretas-azuladas, visto que as colônias de *E. coli* podem apresentar-se com um reflexo verde metalizado característico, como consequência da sua rápida fermentação da lactose (BD, 2017). Neste estudo, 95% dos isolados (clínicos e de ambiente) apresentaram a viragem característica do meio, demonstrando a sua aplicabilidade para o isolamento e a identificação presuntiva dos isolados. Os testes de KOH a 3%, coloração Gram e Bactray I e II complementaram a caracterização fenotípica dos isolados.

A PCR espécie-específica confirmou todos isolados como *E. coli*. Os testes moleculares, baseados em PCR, são vantajosos pela alta reprodutibilidade, simplicidade da técnica de execução, disponibilidade de reagentes e rapidez (BELKUM et al., 2007).

6.2 Grupo genético

Este método rápido de classificação dos grupos genéticos para *E. coli* por PCR apresenta acurácia de mais de 99% comparado com outros métodos de referência (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000).

Os resultados obtidos indicam que MPEC pertencem a diferentes grupos genéticos, com a predominância dos grupos B1 e B2, não diferindo significativamente ($p > 0,05$) entre eles e, em menor número, aos grupos D e A que diferiram dos grupos B1 e B2 de forma significativa ($p < 0,05$), ratificando estudo realizado por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000). Estes autores verificaram que os isolados virulentos extraintestinais pertenciam, principalmente, ao grupo B2 e em menor extensão ao grupo D.

Blum e Leitner (2013), também, destacaram o grupo B1, identificando-o em 51% dos isolados de mastite, similar ao resultado encontrado por Dogan et al. (2012) que destacaram o grupo B1 e o grupo A como grupos predominantes em isolados de *E. coli* associados com mastites bovina persistentes e transitórias.

Nos isolados de ambiente, os resultados foram semelhantes aos isolados de mastite, predominando os grupos B1 e B2, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os grupos e, em relação à origem dos isolados, se de mastite ou do ambiente ($p>0,05$).

Assim como fatores geográficos e do hospedeiro são importantes para a presença de *E. coli*, em determinada espécie, também, têm significado para a distribuição de estirpes dos diferentes grupos genéticos deste agente entre as espécies hospedeiras. Em estudo realizado por Gordon e Cowling (2003), demonstrou-se que fatores como dieta, morfologia intestinal e massa corporal podem interferir, na distribuição dos grupos genéticos dentre os mamíferos. As cepas dos grupos A e B1 demonstraram ser mais comuns, podendo ser recuperadas de qualquer grupo de vertebrados, enquanto as cepas dos grupos B2 e D são mais restritas a vertebrados endotérmicos. Este estudo também demonstrou que, em pássaros e mamíferos carnívoros, há predominância de cepas do grupo B1, enquanto animais herbívoros e onívoros possuem cepas do grupo B2, sendo os grupos A e D mais raros.

A classificação dos grupos genéticos tem grande relevância, para os levantamentos epidemiológicos, além de poder ser empregada, em laboratórios como triagem para isolados de *E. coli*, auxiliando nos estudos de seleção de cepas para produção de vacinas, por exemplo. No entanto mais estudos devem ser realizados para a melhor caracterização dos grupamentos genéticos em *E. coli* associadas com a mastite bovina.

6.3 Genes de virulência

O perfil 5 foi o mais freqüente, representando 39,13% dos isolados de MPEC, apresentando os genes de virulência *fliC* e *escN*; enquanto, nos isolados ambientais, apareceu em terceiro lugar dentre os perfis mais frequentes, compreendendo 19,35% dos isolados. Os genes *fliC* e *escN* foram os mais frequentes entre os isolados de MPEC analisados neste estudo, com frequências de 73,91% e 55,07%, respectivamente (Tabela 3).

O perfil 3 apresentou-se como o segundo mais frequente entre os isolados de MPEC com 14 (20,28%). Este perfil diferiu-se do perfil 5 em decorrência da detecção do gene *fliC* como único gene de virulência e do perfil 4 no qual não se detectou nenhum dos genes de virulência selecionados para este estudo (Tabela 3).

O gene *lpfA* foi detectado em 17,39% (n= 12) dos isolados e esteve presente em quatro dos cinco demais perfis de virulência encontrados neste estudo. Este gene está relacionado com a aderência e invasão de células epiteliais da glândula mamária. Os genes *F17* e *icm* não foram detectados nos isolados selecionados para este estudo.

Em relação às amostras ambientais, o perfil 7 foi o mais frequente com 41,93% (n=13), destacando-se pela presença dos genes de virulência *escN* e *lpfA*. Logo, em seguida, aparecem os perfis 8 com 22,58% (n=7), perfil 5 com 19,35% (n=6) e perfil 6 com 16,12% (n=5). Os perfis 1, 2, 3 e 4 não foram observados nos isolados de origem ambiental (Tabela 3).

Os genes de virulência *lpfA*, *fliC* e *escN* destacaram-se tanto no grupo de isolados de MPEC quanto no grupo de amostras ambientais como demonstrado na Figura 5. Os resultados evidenciam que os genes de virulência *escN* e *lpfA* estão mais associados a isolados do ambiente e o gene *fliC* aos isolados de MPEC, não havendo diferença significativa entre os grupos genéticos e os perfis de virulência em relação a isolados de MPEC ou de ambiente (Tabela 4).

No presente estudo demonstrou-se a existência de oito perfis de virulência na população, com as combinações de diferentes genes de virulência. Apenas três genes de virulência (*fliC*, *escN* e *lpfA*) foram detectados, verificando-se que os genes *escN* e *lpfA* estão mais associados a isolados do ambiente e o gene *fliC* a isolados de MPEC. Porém, comparativamente aos isolados de ambiente, não se verificou entre os genes pesquisados nenhum que pudesse ser um marcador molecular, para os isolados de MPEC, fato que, também, foi constatado em estudos anteriores em relação a outros genes de virulência pesquisados (BLUM; LEITNER, 2013).

O gene de virulência *fliC* foi o mais frequente, estando presente em 73,91% dos isolados de MPEC. Segundo Silva et al. (2014), a flagelina (codificada pelo gene *fliC*) possui importante papel, para a formação de biofilmes, conferindo motilidade e o deslocamento das células, para ambientes favoráveis, facilitando, assim, sua proliferação e disseminação.

Em um estudo com *Pseudomonas aeruginosa* mutantes de flagelina (*fliC*), em modelos de ratos recém-nascidos com pneumonia, foi demonstrado que as cepas mutantes foram incapazes de causar a morte dos animais desafiados, enquanto a cepa do tipo selvagem causou 30% de mortalidade (JOSENHANS; SUERBAUM, 2002). A alta frequência deste gene, nos isolados de mastite, sugere que este atributo pode ter um importante papel na patogênese de MPEC. Já, nos isolados de ambiente, o gene *fliC* foi detectado em apenas 35,48% das amostras ($p < 0,05$).

O SST3 é um dos principais fatores de virulência dentre as bactérias gram-negativas. Sua presença constitui um indicador chave de virulência em *E. coli* (KYAW et al., 2003), no entanto pouco se sabe sobre a importância deste sistema de secreção em MPEC.

Este sistema permite que proteínas efetoras sejam injetadas, diretamente no interior da célula hospedeira, modulando funções bioquímicas do hospedeiro,

como exemplo, a estrutura do citoesqueleto, morte celular programada, progressão do ciclo celular, tráfego endocítico e a expressão gênica (BÜTTNER, 2012; MARLOVITS; STEBBINS, 2010).

Neste estudo, verificou-se que o gene *escN* esteve presente em 55,07% (n=38) dos isolados MPEC e, também, no perfil mais frequente (perfil 5) juntamente com o gene *fliC*. A presença destes fatores de virulência pode estar associada à maior adaptação, para colonização e infecção da glândula mamária em bovinos, explicando, assim, a sua maior distribuição dentre as amostras deste estudo. Em relação às amostras de ambiente, *escN* esteve presente em todos os isolados de fezes do ambiente de ordenha ($p < 0,05$).

O fato de o SST3 estar presente tanto nos isolados de MPEC quanto nos obtidos do ambiente de ordenha pode sugerir que este aparato de secreção não desempenhe papel relevante, nas infecções intramamárias, contudo deve-se frisar a origem ambiental da mastite, ocasionada por *E. coli* e a especificidade funcional desta estrutura que é a de translocação de proteínas efetoras, no interior de células dos tecidos dos hospedeiros, para fins de aderência e invasão celular (BÜTTNER, 2012; CUNHA et al., 2015; LIU et al., 2014; MARLOVITS; STEBBINS, 2010).

Pode ser que este sistema de secreção esteja presente, mesmo em isolados de *E. coli* que fazem parte da microbiota entérica normal dos animais, possibilitando a colonização intestinal. Como *escN* é um gene conservado, isto explicaria sua presença tanto nos isolados de mastite quanto nos isolados de *E. coli* de ambiente. Deve-se ressaltar que SST3 é uma estrutura complexa que envolve a expressão concatenada de diferentes genes que codificam mais de 20 proteínas que compõem a “seringa e agulha molecular” (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). No presente estudo, pesquisou-se a presença de *escN*, um gene que está presente na base do SST3, sendo considerado um gene conservado deste sistema, mesmo entre diferentes gêneros de bactérias gram-negativas e

responsável pela regulação da ATPase. As especificidades quanto ao SST3 estão relacionadas aos genes que codificam os componentes mais superficiais relacionados à interação com a célula hospedeira (MARLOVITS; STEBBINS, 2010; VIEIRA, 2009).

Além disto, Josenhans e Suerbaum (2002) apontaram uma relação íntima tanto estrutural quanto funcionalmente, em relação ao sistema flagelar e o sistema de exportação e translocação de proteínas (SST3). A presença concomitantemente dos genes *fliC* e *escN*, verificada no presente estudo (31 isolados de MPEC), corrobora com estudos em bactérias como a *Salmonella* (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009), *Shigella*, *Yersinia* (BÜTTNER, 2012; JOSEHANS; SUERBAUM, 2002), fato este que demonstra a importância destes dois genes como marcadores moleculares, desempenhando papéis importantes no estabelecimento e manutenção da infecção por este microrganismo.

O gene *lpfA* tem sido associado com o incremento de virulência em *E. coli* na glândula mamária por mediar a adesão epitelial (BLUM; LEITNER, 2013; DOGAN et al., 2012). Este gene foi identificado em 12 amostras isoladas de mastite e em 18 provenientes do ambiente. O mesmo esteve presente, conjuntamente com o gene *escN*, em 23 dos isolados testados. O gene *lpfA*, também, tem sido associado à habilidade de invadir células epiteliais da glândula mamária de bovinos, evento que, juntamente com a adesão, são importantes, para estabelecer uma infecção e possibilitar a translocação de proteínas efetoras. Além disso, verifica-se o envolvimento do gene *lpfA* na aderência e invasão da bactéria *E. coli*, para atingir as placas de Peyer, no íleo de pacientes com doença de Crohn (DOGAN et al., 2012).

O SST6 mostra-se de grande importância, para patogênese de outros patótipos de *E. coli*, como em APEC atuando na translocação de proteínas efetoras, na célula do hospedeiro (MA et al., 2013), porém, neste estudo, o gene

icm relacionado à expressão deste aparato de secreção, não foi detectado, em nenhum dos isolados testados, indicando não ter relevância em isolados de *E. coli* associados com a mastite bovina.

Cepas de *E. coli* causadoras de doenças intestinal e extraintestinal em animais e humanos, geralmente, expressam fímbrias da família *F17* e outros fatores de virulência associados com a habilidade de causar septicemia como resistência ao soro, produção de aerobactina dentre outros. Neste estudo, não foram detectados isolados positivos para este gene. Cepas de *E. coli* que produzem fímbrias *F17* constituem um grupo heterogêneo, de acordo com sua origem clínica, propriedades de virulência e sorogrupos, sendo detectadas, principalmente, em fezes de ovinos e caprinos com diarreia e cabritos (CID et al., 1999). Com os resultados, sugere-se que este fator de virulência não seja relevante em *E. coli* associada à mastite bovina.

Nos resultados do presente estudo, apontou-se ampla diversidade genética quanto aos fatores de virulência, presentes em amostras clínicas e amostras isoladas de ambiente, no entanto, dentro dos limites do estudo, não se observou nenhum perfil genético que permitisse caracterizar amostras associadas com a mastite e amostras de origem ambiental, indicando a necessidade de estudos complementares nesta linha, considerando que as manifestações de mastite por *E. coli* são determinadas por efeitos combinados de fatores entre hospedeiro, patógeno e ambiente.

7 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos indica-se que os isolados de MPEC e de *E. coli* de origem ambiental pertencem a diferentes grupos genéticos, com a predominância dos grupos B1 e B2 e, em menor frequência, aos grupos D e A.

Em relação aos genes de virulência, os resultados apontaram para três genes de virulência principais, para *E. coli* mamária e os isolados do ambiente, sendo eles *fliC*, *escN* e *lpfA*.

REFERÊNCIAS

AITKEN, S. L.; CORL, C. M.; SORDILLO, L. M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, London, v. 16, n. 4, p. 291-304, Dec. 2011.

ALMEIDA, R. A. et al. Intracellular fate of strains of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with acute or chronic mastitis. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 35, n. 2, p. 89-101, Feb. 2011.

BD. **Instruções de utilização**: meios em placas prontos a usar. Disponível em: <<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9068>>. Acesso em: 27 mar. 2017.

BELKUM, A. van et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 13, n. 3, p. 1-46, 2007.

BINGLE, L. E. H.; BAILEY, C. M.; PALLAN, M. J. Type VI secretion: a beginner's guide. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 11, n. 1, p. 3-8, 2008.

BLUM, S. E. et al. Genomic and phenomic study of mammary pathogenic *Escherichia coli*. **PLOS One**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. 1-24, Sept. 2015.

BLUM, S. E.; LEITNER, G. Genotyping and virulence factors assessment of bovine mastitis *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 163, n. 3/4, p. 305-312, 2013.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, London, v. 164, p. 116-128, 2002.

BÜTTNER, D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology**, Washington, v. 76, n. 2, p. 262-310, 2012.

CASCALES, E. The type VI secretion toolkit. **EMBO Reports**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 735-741, 2008.

CHEN, J.; GRIFFITHS, M. W. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram- negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 27, p. 369-371, 1998.

CID, D. et al. Characterization of Nonenterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Producing F17 Fimbriae isolated from diarrheic lambs and goat kids. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 5, p. 1370-1375, 1999.

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

COSTA, G. M. et al. Population diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Research in Veterinary Science**, London, v. 93, n. 2, p. 733-735, Oct. 2012.

CUNHA, A. F. da et al. Prevalência, etiologia, e fatores de risco de mastite clínica em rebanhos leiteiros de Viçosa-MG. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 9, n. 2, p. 48-54, 2015.

DEGO, O. K.; OLIVER, S. P.; ALMEIDA, R. A. Host: pathogen gene expression profiles during infection of primary bovine mammary epithelial cells with *Escherichia coli* strains associated with acute or persistent bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 155, n. 2/4, p. 291-297, 2012.

DOGAN, B. et al. Phylogroup and *lpfA* influence epithelial invasion by mastitis associated *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 159, n. 1/2, p. 163-170, 2012.

FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, É.; GYLES, C. L. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research Reviews**, Cambridge, v. 6, p. 17-39, 2005.

GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. **Current Microbiology**, New York, v. 72, n. 4, p. 377-382, 2016.

GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: hosts and geographic effects. **Microbiology**, Reading, v. 149, p. 3575-3586, 2003.

HILLERTON, J. E.; BERRY, E. A. Treating mastitis in the cow: a tradition or an archaism. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 98, p. 1250-1255, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2016.

JOSENHANS, C.; SUERBAUM, S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 291, p. 605-614, 2002.

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

KEEFE, G. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Veterinary Clinics Food Animal**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 203-216, July 2012.

KULKARNI, A. G.; KALIWAL, B. B. Bovine mastitis: a review. **International Journal of Recent Scientific Research**, Netherlands, v. 4, n. 5, p. 543-548, 2013.

KYAW, C. M. et al. Evidence for the presence of a type III secretion system in diffusely adhering *Escherichia coli* (DAEC). **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 3, p. 111-117, 2003.

LE MARÉCHAL, C. et al. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products: a review. **Dairy Science & Technology**, French, v. 91, n. 3, p. 247-282, May 2011.

LIU, Y. et al. Phylogenetic group, virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* associated with bovine mastitis. **Research in Microbiology**, Paris, v. 165, n. 4, p. 273-277, 2014.

MA, J. et al. Genetic diversity and features analysis of type VI secretion systems loci in avian pathogenic *Escherichia coli* by wide genomic scanning. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 20, p. 454-464, Dec. 2013.

MA, L. S.; LIN, J. S.; LAI, E. M. An IcmF family protein, ImpLm, is an integral inner membrane protein interacting with ImpK1, and Its Walker A Motif is required for type VI secretion system-mediated Hcp secretion in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 191, n. 13, p. 4316-4329, 2009.

MALUTA, R. P. ***Escherichia coli* potencialmente patogênica isoladas de ovinos saudáveis criados extensivamente e de carcaças em matadouros**. 2012. 91 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

MARLOVITS, T. C.; STEBBINS, C. E. Type 3 secretion systems shape up as they ship out. **National Institutes of Health**, New York, v. 13, n. 1, p. 47-52, Feb. 2010.

NOTEBAERT, S.; MEYER, E. Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis: a review. **Veterinary Quarterly**, Dordrecht, v. 28, n. 1, p. 2-13, 2006.

PYORALA, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, Paris, v. 34, p. 565-578, 2003.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, Paris, v. 37, p. 369-400, 2006.

RICHARDS, V. P. et al. Genome based phylogeny and comparative genomic analysis of intra-mammary pathogenic *Escherichia coli*. **PLOS One**, San Francisco, v. 25, n. 3, p. E0119799, Mar. 2015.

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

SHPIGEL, N. Y.; ELAZAR, S.; ROSENSHINE, I. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 11, p. 60-65, 2008.

SHRIVASTAVA, S.; MANDE, S. S. Identification and functional characterization of gene components of type VI secretion system in bacterial genomes. **PLOS One**, San Francisco, v. 3, n. 8, p. E2955, 2008.

SILVA, O. V. et al. 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**, Washington, v. 80, n. 19, p. 6136-6145, 2014.

TALBOT, B. G.; LACASSE, P. Progress in the development of mastitis vaccines. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 98, p. 101-113, 2005.

TSENG, T. T.; TYLER, B. M.; SETUBAL, J. C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. **BMC Microbiology**, London, v. 9, p. 1-9, 2009.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, p. 406-414, 2009.

VIGUIER, C. et al. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, n. 8, p. 486-493, 2009.

ZADOKS, R. N. et al. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal Mammary of Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 16, n. 4, p. 357-372, Dec. 2011.