

Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina

[Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from bovine mastitis]

M.G. Ribeiro¹, E.O. Costa², D.S. Leite³, H. Langoni¹, F. Garino Júnior², C. Victória¹, F.J.P. Listoni¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP
Caixa Postal 560

18.618-000 - Botucatu, SP

²NAPGAMA-FMVZ-USP- São Paulo, SP

³UNICAMP- Campinas, SP

RESUMO

Avaliou-se a ocorrência de fatores de virulência e do sorotipo O157:H7 em 120 linhagens de *Escherichia coli*, isoladas de 80 casos de mastite clínica bovina e 40 de mastite subclínica. Verificou-se alfa-hemolisina em oito (6,7%) linhagens, isoladas de cinco casos de mastite clínica e três de mastite subclínica e em nenhuma das estirpes detectou-se enteroemolisina. A presença de sideróforos foi encontrada em 11 (9,2%) linhagens, sete de mastite clínica e quatro de subclínica. Em duas (1,7%) estirpes isoladas de mastite subclínica, identificou-se enterotoxina STa. Observou-se efeito citopático em células vero compatível com a produção de verotoxina-VT em cinco (4,2%) linhagens, duas de mastite clínica e três subclínicas. Em uma (0,8%) linhagem isolada de mastite clínica, detectou-se efeito citopático compatível com o fator necrosante citotóxico. Nenhuma estirpe apresentou-se sorbitol-negativa no MacConkey-sorbitol, tampouco aglutinou com o sorotipo O157:H7. Os antimicrobianos mais efetivos foram polimixina B (97,5%) e norfloxacin (95,8%). Observou-se multi-resistência a dois ou mais antimicrobianos em 24 (20%) estirpes, principalmente com o uso de ampicilina e ceftiofur.

Palavras-chave: bovino, mastite, *Escherichia coli*, virulência, toxina, sorotipo O157:H7

ABSTRACT

The occurrence of different virulence factors and O157:H7 serotype investigation in 120 *Escherichia coli* strains isolated from clinical (80 cases) and subclinical (40 cases) bovine mastitis was evaluated. Alpha-haemolysin was detected in 8 (6.7%) strains (5 clinical and 3 subclinical cases). None strain showed enterohaemolysin production. *E. coli* growth under iron restriction conditions (siderophores production) was observed in 11 (9.2%) strains (7 clinical and 4 subclinical cases). STa enterotoxin was detected in 2 (1.7%) strains from subclinical cases. Cytotoxic effect in vero cells compatible with verotoxin-VT production was observed in 5 (4.2%) strains (2 clinical and 3 subclinical cases). One strain (0.8%) isolated from clinical mastitis showed cytophatic effect in vero cells compatible with cytotoxic-necrotic-factor production. None strain showed non-sorbitol fermenting colonies using sorbitol MacConkey agar and agglutination with specific anti-sera for *E. coli* O157:H7 serotype investigation. Polymixin B (97.5%) and norfloxacin (95.8%) were the most effective drugs. Multiple-drug resistance for 2 or more antimicrobials was observed in 24 (20.0%) strains, mainly with use of ampicillin and ceftiofur.

Keywords: bovine, mastitis, *Escherichia coli*, virulence, toxin, serotype O157:H7

Recebido em 21 de outubro de 2004

Aceito em 19 de dezembro de 2005

E-mail: mgribeiro@fmvz.unesp.br

Apoio: CNPq

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é um dos mais prevalentes microrganismos de origem ambiental, na gênese da mastite bovina. As infecções mamárias por *E. coli* ocorrem sob a forma clínica, de maneira hiperaguda ou aguda, nas primeiras semanas pós-parto, caracterizadas pela difícil resolução terapêutica, nos casos com comprometimento sistêmico, e morte ocasional de animais por toxemia (Jones, 1990; Radostits et al., 2000). O microrganismo também tem sido investigado em casos de mastite subclínica bovina (Döpfer et al., 1999; Ribeiro, 2001).

A pluralidade dos fatores de virulência de *E. coli* desperta a preocupação com o envolvimento destes mecanismos de virulência em estirpes isoladas de mastite bovina. Estes fatores são constituídos por componentes lipopolissacarídicos-LPS da estrutura bacteriana (endotoxinas), ou são representados por diferentes cito ou exotoxinas (hemolisinas, fator necrosante citotóxico-CNF, verotoxinas-VT, enterotoxinas), assim como propriedades que permitem a multiplicação em meios com restrição de ferro (sideróforos), a multirresistência aos antimicrobianos, ou a colonização celular (pili, adesinas ou fimbrias) (Sussman, 1997).

As diferentes linhagens de *E. coli* responsáveis principalmente por distúrbios entéricos são agrupadas em seis tipos: enterotoxigênicas, enteroinvasoras, enteropatogênicas, enterohemorrágicas, enteroagregativas e de aderência difusa, subdivididas, fundamentalmente, pela capacidade de produção de determinadas toxinas, de invasão celular ou de manifestação de sintomas clínicos no homem e/ou nos animais (Gyles, 1992; Ribeiro et al., 1999). Recentemente, *E. coli* enteroemorrágica sorotipo O157:H7 tem emergido como causa de graves manifestações clínicas de colite hemorrágica, trombocitopenia e distúrbios renais no homem, freqüentemente fatais em crianças.

Estudos epidemiológicos relacionam os casos de doença humana pelo sorotipo O157:H7, com o consumo de carne de origem bovina, principalmente hambúrgueres, leite e derivados, submetidos ou não à pasteurização, verduras, frutas e água. Alguns pacientes podem evoluir para grave acometimento renal denominado

síndrome urêmica hemolítica, provocado por lesões no endotélio vascular renal, atribuídas à ação de verotoxinas absorvidas a partir do epitélio intestinal (Sussman, 1997; Tauxe, 1997). No Brasil são escassos os estudos conduzidos na investigação de fatores de virulência em estirpes de *E. coli* isoladas de mastite bovina. O presente estudo objetivou determinar a ocorrência de alfa-hemolisinas, enteroemolisinas, sideróforos, enterotoxina STa, CNF, VT, multirresistência aos antimicrobianos e do sorotipo O157:H7 em linhagens de *E. coli* isoladas do leite de bovinos com mastite.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 120 linhagens de *E. coli* isoladas de 80 casos de mastite clínica e 40 de mastite subclínica em bovinos, entre o período de janeiro de 1998 a dezembro de 2003. O diagnóstico de mastite clínica foi realizado com auxílio da prova da caneca telada de fundo escuro, e na presença de sinais de inflamação na glândula mamária e/ou sistêmicos nos animais (Radostits et al., 2000). A mastite subclínica foi caracterizada utilizando o *California Mastitis Test* (CMT) (escores 1+ a 3+) (Schalm et al., 1971). Foram incluídas no estudo somente estirpes de *E. coli* com isolamento puro, com 20 ou mais colônias. As amostras de leite foram semeadas em ágar sangue ovino desfibrinado (5%) e ágar MacConkey, mantidas a 37°C, em aerobiose, por 48 horas. As linhagens de *E. coli* foram identificadas segundo suas características morfológicas, bioquímicas e de cultivo (Krieg e Holt, 1994).

A detecção de hemolisina, enteroemolisina, sideróforos, enterotoxina STa, CNF, VT, sensibilidade microbiana e do sorotipo O157:H7 foi realizada nas 120 linhagens de *E. coli*.

Alfa-hemolisina foi diagnosticada em ágar sangue ovino desfibrinado (5%), a 37°C, em aerobiose, avaliada com quatro e 24 horas; as linhagens com halo de hemólise total foram consideradas alfa-hemolíticas (Sussman, 1997). Como controle utilizou-se cepa de *E. coli* hemolítica P46. Enteroemolisina foi identificada pelo cultivo do agente em ágar triptico de soja-TSA, acrescido de 10mM de CaCl₂ e sangue ovino desfibrinado (5%), não lavado e lavado por centrifugações em PBS. As placas foram

observadas após quatro e 24 horas de incubação, em aerobiose, a 37°C. Repetiu-se o mesmo procedimento utilizando sangue bovino (5%). Halo de hemólise parcial, no meio com hemácias lavadas, foi considerado enteroemolisina-positivo (Catani, 1999). Como controle foi utilizada *E. coli* C3888.

Colônias isoladas de *E. coli* foram cultivadas em ágar nutriente contendo 200µM de Dipiridila, a 37°C, em aerobiose, por 24h (Ferreira e Bottino, 1998). Esse procedimento foi repetido três vezes, consecutivamente, em intervalos de 24h. Ao final da terceira passagem, as estirpes de *E. coli* com multiplicação no meio contendo Dipiridila foram consideradas sideróforo-positivas. Como controle positivo, foi utilizada cepa de *E. coli* K12.

Procedeu-se à detecção de enterotoxina STa utilizando o ensaio biológico em camundongos (Dean et al., 1972), inoculando sobrenadante das culturas adicionado de azul de Evans (2%) em camundongos tipo Swiss. Após a eutanásia, as estirpes que mostraram valores iguais ou superiores a 0,07 (relação peso do intestino e peso da carcaça) foram consideradas positivas. Como controle positivo, foi utilizada *E. coli* O101:H-, K99, STa +.

Colônias isoladas foram submetidas à extração de citotoxinas para detecção de CNF e VT utilizando caldo tríptico de soja-TSB, acrescido de mitomicina C. O sobrenadante foi inoculado em células vero, com efeito citopático avaliado com 24, 48 e 72 horas (Della Colleta, 1997). Consideram-se como CNF-positivas as linhagens que induziram à formação de células gigantes, multinucleadas e à perda da viabilidade celular (destruição da monocamada), enquanto o efeito inicial de alongamento, seguido da perda da viabilidade celular, foi considerado positivo para VT (Gyles, 1992; Sussman, 1997). Como controle positivo, foram utilizadas *E. coli* MR48 (CNF1), B26a (CNF2), H30 (VT1) e J2 (VT2).

Procedeu-se ao teste de sensibilidade microbiana - método de difusão com discos - (Bauer et al., 1966), utilizando-se os seguintes antimicrobianos: amicacina (30mcg), ampicilina (10mcg), cefoperazona sódica (75mcg), ceftiofur (30mcg), ciprofloxacina (5mcg), enrofloxacin (5mcg), florfenicol (30mcg), gentamicina (10mcg), neomicina (30mcg), norfloxacina

(10mcg), polimixina B (300 unidades) e sulfadiazina/trimetoprim (25mcg).

As linhagens foram semeadas no ágar MacConkey-sorbitol, mantidas à temperatura de 37°C, em aerobiose, por 48 horas, para identificação de estirpes não fermentadoras de sorbitol. A presença de colônias incolores foi considerada sorbitol-negativa (Vernozy-Rozand, 1997). Independentemente da fermentação no ágar MacConkey-sorbitol, todas as linhagens foram submetidas ao teste de aglutinação em lâmina, em triplicata, utilizando anti-soros para O157¹ e H7². Como controle de *E. coli* O157:H7, foi utilizada cepa EDL 933.

A associação entre a presença de mastite clínica ou subclínica e a ocorrência dos diferentes fatores de virulência foram avaliadas pelo método de qui-quadrado (exato de Fisher), utilizando o programa Epi-Info (versão 6.04) (Dean et al., 1994), considerando diferença significativa para valores de P<0,01.

RESULTADOS

Na Tab.1 apresentam-se os fatores de virulência detectados em 120 linhagens de *E. coli* isoladas de mastite bovina.

Verificou-se alfa-hemolisina em oito (6,7%) linhagens de *E. coli*, isoladas de cinco (4,2%) casos de mastite clínica e três (2,5%) de mastite subclínica. Não se detectou nenhuma estirpe produtora de enteroemolisina. Linhagens sideróforo-positivas foram observadas em 11 (9,2%) animais, das quais sete (5,8%) provenientes de casos de mastite clínica e quatro (3,3%) subclínicas. Em duas (1,7%) estirpes isoladas de mastite subclínica foram detectadas a produção de enterotoxina STa. O efeito citopático em células vero compatível com a produção de VT foi encontrado em cinco (4,2%) linhagens, duas (1,7%) isoladas de mastite clínica e três (2,5%) subclínicas. Em um (0,8%) isolado, diagnosticado em animal com mastite clínica, verificou-se efeito citopático compatível com CNF.

¹ Probac do Brasil - Produtos Bacteriológicos Ltda - São Paulo, SP®

² Difco - Laboratórios Difco Ltda®

Fatores de virulência em linhagens...

Tabela 1. Ocorrência de diferentes fatores de virulência em 120 linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina

Animal	Mastite	Alfa-hemolisina	Sideróforo	Enterotoxina STa	Efeito citopático em células vero	Multi-resistência a dois ou mais antimicrobianos
4	subclínica	--	--	positivo	--	--
7	subclínica	--	positivo	--	--	3 drogas
9	subclínica	--	positivo	--	--	--
17	clínica	--	positivo	--	--	--
25	clínica	--	positivo	--	--	2 drogas
26	clínica	--	positivo	--	--	3 drogas
42	subclínica	positivo	--	positivo	alongamento e morte celular (VT)	--
46	clínica	--	positivo	--	--	--
47	clínica	positivo	--	--	células gigantes, multinucleadas (CNF)	--
51	clínica	positivo	--	--	--	--
77	clínica	--	positivo	--	--	--
78	subclínica	positivo	--	--	alongamento e morte celular (VT)	3 drogas
79	clínica	--	positivo	--	--	--
81	subclínica	positivo	--	--	--	--
82	clínica	positivo	--	--	--	4 drogas
83	clínica	--	positivo	--	--	2 drogas
84	clínica	positivo	--	--	--	--
89	clínica	--	--	--	alongamento e morte celular (VT)	--
92	clínica	positivo	--	--	--	--
95	clínica	--	--	--	alongamento e morte celular (VT)	3 drogas
97	subclínica	--	positivo	--	--	--
112	subclínica	--	positivo	--	--	2 drogas
120	subclínica	--	--	--	alongamento e morte celular (VT)	--

VT = verotoxina; CNF = fator necrosante citotóxico.

Não se observou nenhuma estirpe de *E. coli* sorbitol-negativa no ágar MacConkey-sorbitol, tampouco aglutinação com o sorotipo O157:H7. Na Tab. 2, são apresentados os resultados do teste de sensibilidade microbiana *in vitro* das linhagens de *E. coli* frente a 12 antimicrobianos. Os maiores índices de sensibilidade do agente foram verificados para polimixina B, norfloxacin e ciprofloxacina. Os maiores índices de resistência foram observados com o uso da ampicilina e do ceftiofur. Constataram-se linhagens de *E. coli* resistentes a dois ou mais antimicrobianos em 24 (20%) estirpes. Não foi encontrada associação significativa ($P>0,01$) entre a presença de mastite clínica ou subclínica e a ocorrência dos fatores de virulência.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Classicamente os casos de mastite por *E. coli* são descritos como manifestações clínicas hiperagudas ou agudas, nas primeiras semanas de lactação, com morte ocasional de animais (Jones, 1990). Nos últimos anos, observa-se em outros países a preocupação com os casos subclínicos de mastite bovina por *E. coli*. Sugere-se que a mastite subclínica por *E. coli* está associada a rebanhos com bom controle de mastite do tipo contagiosa, resultando em infecções persistentes na glândula mamária, tanto na lactação quanto no período seco (Döpfer et al., 1999; Radostitis et al., 2000). Ribeiro (2001), no Brasil, também ressaltou o envolvimento de estirpes de *E. coli* em bovinos com mastite subclínica ao analisar 11.125 amostras de leite de propriedades rurais dos estados de São Paulo e Minas Gerais.

Tabela 2. Sensibilidade microbiana na prova de difusão com discos em 120 linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina

Antimicrobiano	Número de linhagens (%)		
	Sensível	Parcialmente sensível	Resistente
Amicacina (30mcg)	62 (51,7)	49 (40,8)	9 (7,5)
Ampicilina (10mcg)	50 (41,7)	41 (34,2)	29 (24,1)
Cefoperazona (75mcg)	92 (76,6)	26 (21,7)	2 (1,7)
Ceftiofur (30mcg)	27 (22,5)	77 (64,2)	16 (13,3)
Ciprofloxacina (5mcg)	95 (79,2)	25 (20,8)	0 (--)
Enrofloxacina (5mcg)	91 (75,8)	23 (19,2)	6 (5,0)
Florfenicol (30mcg)	56 (46,7)	60 (50,0)	4 (3,3)
Gentamicina (10mcg)	83 (69,2)	27 (22,5)	10 (8,3)
Neomicina (30mcg)	26 (21,7)	84 (70,0)	10 (8,3)
Norfloxacina (10mcg)	115 (95,8)	5 (4,2)	0 (--)
Polimixina B (300 unidades)	117 (97,5)	3 (2,5)	0 (--)
Sulfa / trimetoprim (25mcg)	91 (75,8)	14 (11,7)	15 (12,5)

Sulfa = sulfametoxazole.

Polimixina B, norfloxacina e ciprofloxacina apresentaram alta efetividade *in vitro* nas 120 linhagens de *E. coli*, embora esses princípios ativos não estejam disponíveis comercialmente no país para infusão intramamária (Andrade et al., 2001), o que limita a indicação dessas drogas na terapia da mastite bovina. A crescente descrição de resistência múltipla em estirpes de *E. coli* isoladas do leite de bovinos (Stephan e Kuhn, 1999) tem alertado para o risco de veiculação de linhagens multirresistentes para o homem, mediante o consumo de leite e/ou derivados. Neste estudo, 20% das linhagens de *E. coli* mostraram resistência a dois ou mais antimicrobianos, incluindo drogas consideradas efetivas na terapia do agente (Tab. 2). Presume-se que ocorrência crescente de *E. coli* multirresistentes em casos de mastite bovina possa decorrer do uso indiscriminado de antimicrobianos na terapia intramamária e/ou parenteral, no emprego de subdosagens (Costa et al., 1997), ou mesmo no tratamento sem o respaldo de testes de sensibilidade microbiana, recaindo a escolha da droga na experiência de terapias anteriores ou no apelo comercial dos produtos.

Somente duas linhagens de *E. coli* foram produtoras de enterotoxina STa. Este resultado coincide com os assinalados por Sanches-Carlo et al. (1984) e Barrow e Hill (1989), que detectaram a enterotoxina STa, respectivamente, em 0,5% e 1,0% de animais com mastite clínica. Lipman et al. (1995), em investigação similar, não evidenciaram a produção de STa em *E. coli* isoladas de mastite bovina. A ausência ou baixa

produção de enterotoxina STa em *E. coli* isolada de mastite bovina revela, possivelmente, o reduzido envolvimento desse fator de virulência em infecções mamárias, a despeito do seu impacto em distúrbios entéricos.

O íon ferro é considerado elemento essencial no metabolismo bacteriano. Determinadas linhagens de *E. coli* possuem mecanismos de captação exógena do íon ferro, como a síntese de exoproteínas reconhecidas como sideróforos e hemolisinas. A capacidade de *E. coli* de competir e disponibilizar o ferro no organismo animal, ou mesmo adaptar-se à multiplicação em baixas concentrações do íon, é considerada importante mecanismo de virulência, principalmente em infecções extra-intestinais, incluindo na mastite (Sussman, 1997).

A presença de sideróforos foi observada em onze (9,2%) das 120 linhagens de *E. coli* de bovinos com mastite, sete das quais isoladas de animais com mastite clínica e quatro subclínicas. Kaipainen et al. (2000) obtiveram resultados similares, encontrando sideróforos em 8% de 274 linhagens de *E. coli* isoladas de mastite clínica bovina.

Nas 120 linhagens de *E. coli* foram isoladas oito (6,7%) produtoras de alfa-hemolisina. Tais resultados confirmam os de Barrow e Hill (1989), que evidenciaram 5% de 237 *E. coli* alfa-hemolíticas em bovinos com mastite.

As enteroemolisinas são outro tipo de hemolisinas relacionadas recentemente às

linhagens verotoxigênicas de *E. coli*, isoladas de pacientes humanos com distúrbios entéricos e renais, incluindo no Brasil (Guth et al., 2002). Em animais, as enteroemolisinas estão associadas às linhagens de *E. coli* isoladas de bovinos com e sem diarreia. Hogan et al. (1990) notificaram a produção de enteroemolisina em, respectivamente, 3,9% e 2,6% das estirpes submetidas ao meio contendo hemácias lavadas de ovinos e bovinos, em 76 *E. coli* isoladas de mastite clínica bovina. Nos 120 isolados de *E. coli* obtidos de mastite bovina, não foi possível determinar a presença de efeito lítico compatível com a produção de enteroemolisina. Dessa forma, presume-se que os mecanismos de captação de ferro exógeno - sideróforos, alfa-hemolisinas e enteroemolisinas - devem contribuir na virulência de *E. coli* no desenvolvimento da mastite, embora, provavelmente, não representem mecanismos essenciais na ocorrência de infecções clínicas ou subclínicas na glândula mamária bovina.

A descrição de CNF no homem é ligada a distúrbios entéricos, infecções do trato urinário e septicemias. À semelhança com o homem, nos animais o CNF também está estreitamente associado às infecções extra-intestinais, principalmente em estirpes de *E. coli* produtoras de alfa-hemolisinas (Sussman, 1997). Em células vero, o CNF induz a formação de células gigantes, multinucleadas, e morte celular (Gyles, 1992). Pohl et al. (1993), Lipman et al. (1995) e Kaipainen et al. (2000) notificaram a produção de linhagens de *E. coli* necrotoxigênicas, produtoras de hemolisinas, em bovinos com mastite clínica. A produção simultânea de CNF, de alfa-hemolisina e de sideróforos tem sido relatada em bovinos com mastite (Pohl et al., 1993; Kaipainen et al., 2000). No Brasil, Ribeiro et al. (2002) descreveram linhagem de *E. coli* produtora de CNF, alfa-hemolisina e sideróforo em vaca com mastite clínica hiper-aguda. De maneira similar, detectou-se a produção de CNF e alfa-hemolisina em um animal com mastite clínica, indicando que, provavelmente, as estirpes produtoras de CNF, hemolisinas e/ou sideróforos, deteriam mecanismos adicionais de virulência e estariam associadas, predominantemente, a casos clínicos de inflamação na glândula mamária em bovinos.

É crescente a preocupação com a investigação de *E. coli* verotoxigênicas isoladas do leite de

bovinos (Lipman et al., 1995; Sussman, 1997). Stephan e Khun (1999) notificaram quatro (2,8%) *E. coli* verotoxigênicas, dentre 145 estirpes isoladas de mastite bovina. Neste estudo, foram encontrados cinco isolados mostrando efeito citopático compatível com a produção de VT em dois animais com mastite clínica e em três com mastite subclínica. Linhagens de *E. coli* verotoxigênicas, da classe enteroemorrágica sorotipo O157:H7, são reconhecidas nos últimos anos como agentes emergentes de zoonoses, relacionadas ao consumo pelo homem de produtos e subprodutos de origem bovina, especialmente carne e leite (Ribeiro et al., 1999). Evidências epidemiológicas têm relacionado o consumo de leite *in natura* a casos severos de colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica no homem, assim como a identificação do sorotipo O157:H7 no leite de bovinos, após surtos de doença no homem (Tauxe, 1997). No Brasil, considera-se que Cerqueira et al. (1999) descreveram pela primeira vez *E. coli* O157:H7 em amostras fecais de bovinos encaminhados para o abate.

Nenhuma das 120 linhagens de *E. coli* isoladas de mastite - produtoras ou não de verotoxinas -, caracterizou-se como não fermentadora do sorbitol ou apresentou aglutinação para o sorotipo O157:H7. Este resultado difere dos encontrados em outros países, que têm notificado *E. coli* O157:H7 no leite bovino. Essas divergências dificultam o esclarecimento se *E. coli* sorotipo O157:H7 poderia ser considerado agente primário de mastite, ou ocorreria contaminação cruzada do leite com fezes de animais durante a ordenha, ou no processamento do produto e seus derivados (Tauxe, 1997; Ribeiro et al., 1999). Desse modo, permanece incerta a participação de *E. coli* O157:H7 na gênese de casos de mastite bovina no Brasil, embora a severidade das infecções humanas por *E. coli* O157:H7 apontem para a necessidade de estudos no país, com o intuito de avaliar a participação desse sorotipo em estirpes de *E. coli* isoladas do leite e derivados de origem animal, visando à vigilância epidemiológica do agente. A presença de linhagens de *E. coli* citotoxigênicas e multirresistentes aos antimicrobianos isoladas do leite de fêmeas bovinas, aliado ao hábito de consumo do produto *in natura* no país e/ou o uso na produção de derivados sem tratamento térmico adequado, alerta para o risco em saúde pública representado pela veiculação para o

homem - pelo leite - de *E. coli* com reconhecido potencial de patogenicidade.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Mariza Landgraf da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo, SP, pela cepa EDL 933; ao Dr. Antônio José Piantino Ferreira da FMVZ-USP, São Paulo, SP, pela cepa de *E. coli* K12; ao Dr. Domingos da Silva Leite da Unicamp, Campinas, SP, pela cepa O101:H-,K99⁺ (STa⁺), assim como pela disponibilização das cepas controle-positivas C3888 (enterohemolisina) (Dr. Lothar Beutin do Instituto Robert Koch, Alemanha); MR48 (CNF1) e B26a (CNF2) (Jorge Blanco da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha); H30 (VT1) e J2 (VT2) (Dr. J. Konowalchuck e Dr. Y. Yakeda do International Medical Center, Japão), cedidas da bacterioteca do Laboratório de Antígenos Bacterianos do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Unicamp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S.F.; GIUFFRIDA, R.; RIBEIRO, M.G. Quimioterápicos antimicrobianos e Antibióticos. In: ANDRADE, S.F. *Manual de terapêutica veterinária*. 2.ed. Roca: São Paulo, 2001. p.13-58
- BARROW, P.A.; HILL, A.W. The virulence characteristics of strains of *Escherichia coli* isolated from cases of bovine mastitis in England and Wales. *Vet. Microbiol.*, v. 20, p. 35-48, 1989.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.45, p.493-496, 1966.
- CATANI, C.F. *Purificação e caracterização de enterohemolisina produzida por Escherichia coli enteropatogênicas*. 1999. 101f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP
- CERQUEIRA, A.M.F.; GUTH, B.E.C.; JOAQUIM, R.M. et al. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.70, p.111-121, 1999.
- COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.387-397.
- DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIAMS, R.G. et al. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, v.125, p.407-411, 1972.
- DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COULOMBIER, D. et al. Epi Info Version 6. A Word Processing, Database and Statistical Program for Epidemiology on Microcomputers. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1994. 601p.
- DELLA COLLETA, H.H.M.D. *Purificação e caracterização do fator necrosante citotóxico do tipo 2 (CNF 2) produzido por Escherichia coli*. 1997. 103f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- DÖPFER, D.; BARKEMA, H.W.; LAM, T.J.G.M. et al. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.80-85, 1999.
- FERREIRA, A.J.P.; BOTTINO, J.A. *Patogenia da colibacilose aviária*. São Paulo: Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 1998. 31p.
- GUTH, B.E.C.; SOUZA, R.L.; VAZ, T.M.I. et al. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.8, p.535-536, 2002.
- GYLES, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can. J. Microbiol.*, v.38, p.734-746, 1992.
- HOGAN, J.S.; TODHUNTER, D.A.; SMITH, K.L. et al. Hemagglutination and hemolysis by *Escherichia coli* isolated from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.3126-3131, 1990.
- JONES, T.O. *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle. A review of the literature. *Vet. Bull.*, v.60, p.205-231, 1990.

- KAIPAINEN, T.; POHJANVIRTA, T.; SHPIGEL, N.Y. et al. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IMMUNOLOGY OF RUMINANT MAMMARY GLAND, 1., 2000, Stressa. *Proceedings...* Stressa: Internacional Dairy Federation, 2000. p.314-318.
- KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 984p.
- LIPMAN, L.J.A.; NIJS, A.; GAASTRA, W. Isolation and identification of fimbriae and toxin production by *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis. *Vet. Microbiol.*, v.47, p.1-7, 1995.
- POHL, P.; OSWALD, E.; MUYLEM, K. V. et al. *Escherichia coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. *Vet. Res.*, v. 24, p. 311-315, 1993.
- RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. et al. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9.ed. London: W.B. Saunders, 2000b. p.603-700.
- RIBEIRO, A.R. *Estudo da mastite bovina causada por microrganismos ambientais: influência do manejo e higiene, sazonalidade e qualidade microbiológica da água*. 2001. 138f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S. et al. Fator necrosante citotóxico em *Escherichia coli* isolada de mastite clínica bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, p.648-650, 2002.
- RIBEIRO, M.G.; SILVA, E.O.T.R.; PINTO, J.P.A.N. *Escherichia coli* O157:H7. De hambúrguer, leite e outros gêneros alimentícios à colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica. *Rev. Hig. Aliment.*, v.13, p.88-99, 1999.
- SANCHES-CARLO, V.; McDONALD, J.S.; PACKER, R.A. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from cows with acute mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.45, p.1775-1777, 1984a.
- SCHALM, O.W.; CARROL, E.; JAIN, N.C. *Bovine mastitis*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. 360p.
- STEPHAN, R.; KUHN, K. Prevalence of verotoxigenic-producing *Escherichia coli* (VTEC) in bovine coli mastitis and their antibiotic resistance patterns. *Zentralbl. Vet.*, v.46, p.423-427, 1999.
- SUSSMAN, M. *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. United Kingdom: Cambridge University, 1997. 639p.
- TAUXE, R.V. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg. Infect. Dis.*, v.3, p.1-13, 1997.
- VERNOZY-ROZAND, C. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in food. *J. Appl. Microbiol.*, v.82, p.537-551, 1997.