



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO



IDENTIFICAÇÃO *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICAS EM
BEZERROS

JULIANE FRANCIELLE TUTIJA

Campo Grande - MS

2020

JULIANE FRANCIELLE TUTIJA

**IDENTIFICAÇÃO *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICAS EM
BEZERROS**

IDENTIFICATION DIARRHEAGENIC *Escherichia coli* IN CALVES

JULIANE FRANCIELLE TUTIJA

Orientador: Cássia Rejane Brito Leal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS

2020

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a vida, saúde e força para superar as dificuldades e conseguir alcançar meus sonhos.

A minha mãe Valéria Regina Scantamburgo por batalhar mais do que qualquer outra pessoa para que esse sonho se realizasse. Muito obrigada a senhora é o exemplo que vou seguir pelo resto de minha vida.

A minha irmã Jacqueline Tutija e minha sobrinha Maria Eduarda Tutija que sempre estiveram ao meu lado me apoiando.

As minhas avós Dalva Calderon e Tercília Píres por me ensinarem a amar e respeitar os animais.

A minha tia Cristiane de Cássia Scantamburgo por me ajudar desde a terceira série a estudar sempre com muita disciplina e carinho.

A todos os meus familiares que me incentivaram no decorrer desta etapa.

Ao esposo Gustavo Lourenço de Lima pelo carinho, compreensão, dedicação, respeito e por me fazer tão feliz.

Aos meus amigos de faculdade que estiveram ao meu lado nos dias bons e ruins e que contribuíram muito para que esse trabalho acontecesse, Amanda Alice, Mariana Green, Guilherme Reckziegel, Zelina Freire, Rodrigo Leite e Dyego Borges.

A minha orientadora Cássia Leal e meu coorientador Carlos Alberto do Nascimento Ramos pela oportunidade e por dedicarem seu tempo me orientando sempre com tanta dedicação e carinho.

Ao pessoal do laboratório de bacteriologia e biologia molecular da FAMEZ. Em especial a técnica Lúcia Restel e ao técnico Hebert Cleveland.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da FIOCRUZ-RJ e a prof. Dra. Juliana Felipetto Cargnelutti (UFSM) pelas doações de cepas de referência, que fizeram com que este trabalho fosse possível.

A Dra. Raquel Soares Juliano e Dra. Larissa Gabriela Ávila por participarem como componentes da banca de defesa da minha dissertação de mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido durante o mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vi
Abstract.....	vii
CAPITULO 1	7
1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	8
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
3.1 <i>Escherichia coli</i>	9
3.2 Patótipos de <i>Escherichia coli</i>	9
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica.....	10
3.2.2 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica.....	11
3.2.3 <i>Escherichia coli</i> Produtora da Toxina Shiga e enterohemorrágica.....	13
3.2.4 <i>Escherichia coli</i> necrotoxigênica.....	14
3.3 Diagnóstico.....	15
3.3.1 Diagnóstico bacteriano.....	15
3.3.2 Diagnóstico sorológico.....	17
3.3.3 Diagnóstico molecular.....	18
3.4 Resistência antimicrobiana.....	19
3.5 Prevenção	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO 2	26
ARTIGO- CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> CAUSADORAS DE ENTERITE EM BEZERROS	
ANEXOS.....	43
Projeto Aprovado.....	43
Autorizações Legais	45
Questionário epidemiológico.....	47
Normas da Revista	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR e seus respectivos alvos e produtos de amplificação.....	31
Tabela 2.	Classificação dos patótipos de <i>Escherichia coli</i> de acordo com o gene de virulência.....	32
Tabela 3.	Perfil genético associado aos patótipos de <i>E. coli</i> EPEC, EHEC e STEC em amostras oriundas de bezerros.....	34

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.	Esquema de adesão ETEC, após fixação da bactéria na mucosa intestinal, liberação das enterotoxinas LT e ST.....	10
Figura 2.	Esquema de adesão EPEC, demonstrando adesão da bactéria e posteriormente condensação de actina e destruição das vilosidades (lesão A/E)	12
Figura 3.	Esquema adesão EHEC e STEC, apresentando destruição das vilosidades por EHEC, devido a lesão A/E, posteriormente entrada das Shiga toxinas devido aos dois patótipos.....	13
Figura 4.	Colônias típicas de <i>Escherichia coli</i> em ágar MacConkey.....	16
Figura 5.	Provas bioquímicas caracterizando o isolado como <i>Escherichia coli</i>	16
Figura 6.	Estrutura antigênica de <i>E. coli</i>	17

Capítulo 2

Figura 1.	Mapa do Estado do Mato Grosso do Sul dividido em Macrorregiões, sendo demarcados em preto a localização das propriedades.....	29
Figura 2.	Resultados da avaliação de sensibilidade antimicrobiana.....	33
Figura 3.	Eletroforese de amostras positivas em gel de agarose 2% utilizando marcador molecular de 50 pares de base, com visualização de bandas de genes de virulência (lt2, eae, stx1, stx2 e sta).....	35

TUTIJA, J. F. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE CEPAS DE *Escherichia coli* CAUSADORAS DE ENTERITE EM BEZERROS 2020. Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2020.

RESUMO

Cepas de *Escherichia coli* causadoras de enterite são consideradas importante causa de diarreia em bezerros principalmente nas primeiras semanas de vida. Para correta identificação, esses micro-organismos devem ser diferenciados dos membros não patogênicos, que compõem a microbiota intestinal. Este trabalho teve por objetivo caracterizar os isolados de *E. coli* em bezerros, quanto à presença de genes de virulência para enterite no estado de Mato Grosso do Sul. Foram obtidas 176 amostras de fezes de bezerros portadores de diarreia, com idade até dois meses, de diversas propriedades do estado de Mato Grosso do Sul. Também foram avaliadas 27 amostras de animais sadios das mesmas propriedades. Por meio do cultivo bacteriológico foi possível identificar *E. coli* em todas as amostras e realizar antibiograma pela técnica de disco difusão. Posteriormente, as amostras foram submetidas a reações de PCR para identificação dos seguintes patótipos: ETEC, EHEC, STEC, EPEC e NTEC. Foi possível identificar em 35 amostras o gene *eae* (19,88%), em 135 amostras o gene *stx1* (76,70%), o gene *stx2* em 62 amostras (35,22%), o gene *sta* em 159 (90,34%) e o gene *ltII* em 35 amostras (19,88%). Em nenhuma delas identificaram-se os genes *cnf1* e 2. De acordo com esses resultados, os isolados foram classificados em EPEC (3), EHEC (32), STEC (122) e ETEC (173). Em relação à sensibilidade antimicrobiana, 77,2% dos isolados foram resistentes a três ou mais grupos farmacológicos, caracterizando-os como multirresistentes; essa multirresistência contribui para a ocorrência de infecções bacterianas resistentes aos antimicrobianos na espécie humana, levando ao alerta para a importância da Saúde Única. Esse estudo fornece dados epidemiológicos importantes sobre a doença no estado e no Brasil.

Palavras-chave: Bactéria, diarreia, PCR, resistência.

ABSTRACT

Escherichia coli strains that lead to enteritis, are important causes of diarrhea in calves, especially in the last weeks of life. For correct identification, these microorganisms must be differentiated from non-pathogenic members, which make up an intestinal microbiota. This work aimed to characterize *E. coli* from calves, regarding the presence of virulence genes for enteritis in the state of Mato Grosso do Sul. A hundred seventy six stool samples were obtained from calves with diarrhea, aged up to two months, from several properties in the state of Mato Grosso do Sul. Twenty seven samples of healthy animals from these properties were also evaluated. Through bacteriological culture, it was possible to identify *E. coli* in all samples and perform an antibiogram using the disk diffusion technique. Later, the samples were submitted to a PCR review to identify the following standards: ETEC, EHEC, STEC, EPEC and NTEC. It was possible to identify the *eae* gene in 35 samples (19.88%), the *stx1* gene in 76 (76.70%), the *stx2* gene in 62 (35.22%), the *hlyE* gene in 159 (90, 34 %) and the *ltII* gene in 35 samples (19.88%). The *cnf1 and 2* genes were not identified in any of them. According to these results, the isolates were classified into EPEC (3), EHEC (32), STEC (122) and ETEC (173). Regarding antimicrobial sensitivity, 77.2% of individuals were resistant to three or more pharmacological groups, characterizing them as multidrug-resistant; this multidrug resistance contributes to the occurrence of bacterial infections resistant to antimicrobials in the human species, raising the alert for the importance of Unique Health. This study provided important epidemiological data on the disease in the state and in Brazil.

Key words: Bacterium, diarrhea, PCR, resistance.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo com 215,2 milhões de cabeças, sendo o segundo maior produtor de carne bovina com a produção per capita de 35 Kg/hab/ano, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. A região Centro-Oeste possuía, em 2017, 74,1 milhões de cabeças, respondendo por 34,5% do total nacional. O Estado de Mato Grosso era o maior produtor entre os estados (13,8% do total nacional). Entre os municípios, São Félix do Xingu (PA), Corumbá (MS) e Ribas do Rio Pardo (MS) tiveram as maiores participações (IBGE, 2018), sendo os dois últimos municípios pertencentes ao estado de Mato Grosso do Sul.

A enterite em bezerro é uma das principais causas de perda econômica com alta morbimortalidade na indústria pecuária em todo o mundo, principalmente nas quatro primeiras semanas de vida (COURA et al., 2015). Alguns estudos estimaram que a mortalidade relacionada à ocorrência de diarreia em bezerros, principal sinal clínico da enterite, varia de 10,3% a 34% em todo o mundo (MOTA et al., 1990; BOTTEON et al., 2008; PUPIN et al., 2019). Em bezerros da raça Nelore, por exemplo, é considerada a principal causa de perdas econômicas em rebanhos de vários estados do Brasil (BENESI, 1999; MOTA et al., 2000; AZEVEDO, et al., 2017).

As perdas econômicas decorrem principalmente da morte de bezerros, as quais ocorrem devido à perda de água e eletrólitos nesses animais, o que resulta em desidratação, desequilíbrios eletrolíticos e acidose metabólica. Vários fatores de risco influenciam a ocorrência da doença, como idade do animal, condição imunológica, higiene, manejo e clima (FOSTER & SMITH, 2009).

Enteropatógenos de origem bacteriana, parasitária e viral podem estar envolvidos, isolados ou em associação, na casuística de enterites em bezerros, principalmente *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., rotavírus, coronavírus e protozoários dos gêneros *Eimeria* spp. e *Cryptosporidium* spp. Muitos deles apresentam potencial zoonótico, estando associados a ocorrência de distúrbios entéricos em humanos. Destaca-se a *Escherichia coli* (*E. coli*), que é o agente etiológico da colibacilose.

A cepas de *E. coli* podem ser classificadas em grupos, de acordo com as características individuais de patogenicidade: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* necrotoxigênica (NTEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Em estudo realizado em Mato Grosso do Sul por Salvadori et al., (2003), das 205 linhagens de *E.coli*, foram encontradas 83 (40,05%) cepas positivas para pelo menos um dos fatores de virulência, todas eram provenientes de bezerros que apresentavam diarreia, com idade até 60 dias. Isso demonstra a importância de diferenciar essas cepas.

Apesar de *E. coli* ser apontada como importante causadora de enterite em bezerros (BLANCHARD 2012), devido a etiologia variada, sinais clínicos inespecíficos e presença de cepas não patogênicas compondo a microbiota normal dos animais, torna-se difícil definir o quão importante essa bactéria é na etiologia das enterites em bezerros. Dessa forma, são necessários estudos detalhados sobre a ocorrência e frequência de fatores de virulência produzidos por cepas de *E. coli* nesses animais, buscando-se associações com características clínicas e epidemiológicas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar os isolados de *E. coli* de bezerros, quanto à presença de genes de virulência e resistência a antimicrobianos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade das bactérias frente a diferentes antimicrobianos.
- Identificar potenciais fatores de risco associados à infecção.
- Caracterizar por meio da técnica de PCR os isolados de *E. coli*, para determinar fatores de virulência que possam estar envolvidos no surgimento da enterite.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Escherichia coli*

As bactérias *E. coli* são classificadas como Gram negativas, fermentativas e anaeróbias facultativas. Medem de 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm, sendo a maioria móvel devido à existência de flagelos peritríqueos. A temperatura ótima de crescimento é de 37 °C, sendo cultivadas facilmente em meios de cultura de rotina (BARNES et al. 2003; OLIVEIRA et al., 2004; QUINN et al., 2005). A via de transmissão da bactéria é fecal-oral por meio de água e alimentos contaminados.

São comumente isoladas de fezes e na maioria das vezes são comensais, não causando doença em seus hospedeiros. Entretanto, alguns patótipos não patogênicos presentes no intestino, em animais debilitados, imunocomprometidos ou com a barreira gastrointestinal alterada, podem causar infecção (NATARO; KAPER, 1998).

Existem cepas de *E. coli* patogênicas que são agrupadas de acordo com seus mecanismos de patogenicidade, em patótipos que estão frequentemente associados a doença e lesões em animais (BARNES et al., 2003; KNÖBL et al., 2006; BERCHIERI JUNIOR et al., 2009). Desta forma, para confirmação de enterite por *E. coli* é necessária a identificação de amostras de *E. coli* causadoras de enterite (NATARO; KAPER, 1998; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

A identificação de *E. coli* causadora de enterite requer sua diferenciação das espécies não patogênicas da microbiota intestinal (ROBINS-BROWNE et al., 2004). A importância dessa identificação ocorre em virtude de tratar ou não os animais e também está relacionada com a identificação de animais portadores, pois esses bezerros podem atuar como reservatórios importantes de *E. coli* patogênica humana (COBBOLD et al., 2007).

3.2 Patótipos de *Escherichia coli*

Cepas de *E. coli* que causam diarreia são classificadas em categorias patogênicas de acordo com fatores de virulência específicos, codificados por cromossomos, plasmídios e DNA de bacteriófagos. Esses fatores de virulência

forneem a cada categoria uma capacidade de causar síndrome clínica com características epidemiológicas e patológicas distintas (TOMA et al., 2003).

Já foram identificados cinco patótipos de *E. coli* associados à enterite em bezerros: *E. coli* enterotoxigênica, *E. coli* enteropatogênica, *E. coli* produtora de toxina Shiga, *E. coli* enterohemorrágica e *E. coli* necrotoxigênica. Outros patótipos diarreio gênicos para seres humanos, como *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* de aderência difusa e *E. coli* enteroagregativa, ainda não foram confirmados como causadores de enterite em bezerros (NATARO; KAPER, 1998; DEBROY; MADDOX, 2001; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Todos esses patótipos podem ser identificados molecularmente por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

3.2.1 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

Estas cepas de *E. coli* são caracterizadas por colonizarem a superfície da mucosa do intestino delgado (Figura 1), principalmente o íleo, e por produzirem enterotoxinas termoestáveis (ST) e termolábeis (LT) que alteram as funções dos enterócitos. A consequência é o aumento da secreção e a redução da absorção de líquidos, sem induzirem alterações morfológicas significativas no intestino (NATARO; KAPER, 1998).

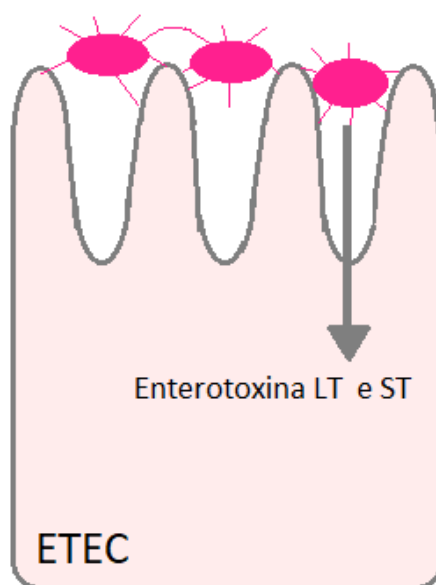


Figura 1. Esquema de adesão ETEC, após fixação da bactéria na mucosa intestinal, liberação das enterotoxinas LT e ST (Bueno, 2010 adaptado).

A enterotoxina termolábil (LT) é semelhante à toxina da cólera, sendo dividida em dois tipos: LT-I e LT-II. As amostras de ETEC de origem bovina não produzem LT-I (BLANCO *et al.*, 1991), existindo apenas a descrição de amostras produtoras de LT-II (SERIWATANA *et al.*, 1988).

A enterotoxina termoestável (ST) é uma família de pequenas toxinas, as quais podem ser divididas em dois grupos: as solúveis (STa) e as insolúveis em metanol (STb), ambas codificadas por plasmídios (CAMPOS & TRABULSI, 2002; BERCHIERI JUNIOR *et al.*, 2009). A enterotoxina STa é produzida por ETEC de animais (bovinos, ovinos, suínos e caninos) e seres humanos, já a STb foi encontrada apenas em ETEC isoladas de suínos (MAINIL, 2013).

A cepa *E. coli* ETEC é o patótipo mais comumente associado à enterite em bezerros na primeira semana de vida, principalmente entre três e quatro dias de vida (FOSTER; SMITH, 2009; BLANCHARD, 2012). Eles podem apresentar diarreia profusa pastosa a líquida, com odor fétido e coloração amarelada a branca. Nos casos agudos, a perda de água e eletrólitos é rápida, e os animais apresentam desidratação grave e acidose metabólica, podendo levá-los a óbito.

3.2.2 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Esta cepa de *E. coli* tem como principal característica causar uma lesão denominada de *attaching and effacing* (anexando e apagando) - A/E. A lesão A/E é caracterizada por uma adesão íntima da bactéria ao epitélio intestinal, com destruição das microvilosidades, alterações no citoesqueleto, com formação de estruturas semelhantes a pedestais e acúmulo de actina polimerizada logo abaixo da ligação da bactéria à célula (Figura 2) (SYDOW, 2005). Os principais genes responsáveis pela lesão A/E estão inseridos numa ilha de patogenicidade denominada LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), também presente no patótipo EHEC (NATARO; KAPER, 1998; MAINIL; DAUBE, 2005).

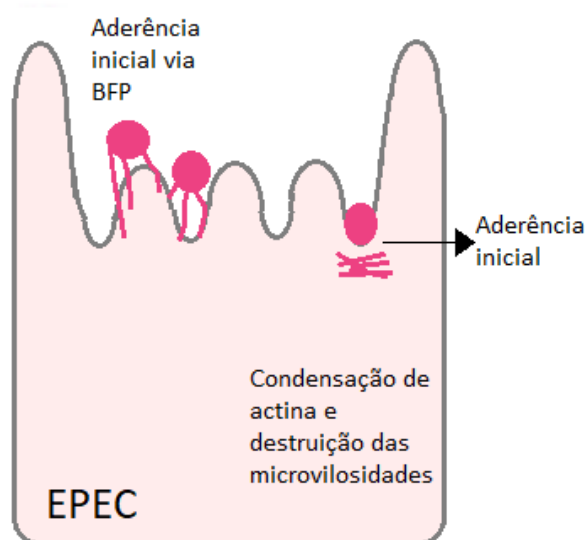


Figura 2. Esquema de adesão EPEC, demonstrando adesão da bactéria e posteriormente condensação de actina e destruição das vilosidades (lesão A/E) (Bueno, 2010 adaptado).

As cepas de *E. coli* capazes de causar esse tipo de lesão são também denominadas AEEC (*attaching and effacing Escherichia coli*). A adesina intimina, uma proteína de 94 kDa da membrana externa da bactéria, é codificada pelo gene *eae* localizado na LEE e é a molécula de adesão responsável pela ligação íntima da bactéria ao enterócito.

Além da ilha de patogenicidade LEE, a bactéria EPEC pode apresentar um plasmídeo chamado “*EPEC adherence factor*” (EAF), com genes envolvidos na expressão e montagem da fímbria denominada “*bundle-forming pillus*” (BFP), responsável pela aderência localizada da bactéria ao epitélio intestinal. Amostras de EPEC portadoras do plasmídeo EAF e da fímbria BFP são denominadas EPEC típicas, e quando negativas EPEC atípicas (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Elas não produzem nenhuma enterotoxina ou citotoxina (CROXEN & FINLAY, 2010).

Não há uma faixa etária com maior susceptibilidade, como ocorre com ETEC, sendo detectada a infecção por EPEC em bezerros com uma a 12 semanas de idade (HOLLAND et al., 1999; FOSTER; SMITH, 2009). As fezes podem estar aquosas ou normais, amareladas ou sanguinolentas. A infecção por EPEC resulta em quadro mais crônico de diarreia, diferentemente da ocorrência aguda da colibacilose por ETEC.

Os sinais clínicos da colibacilose por EPEC não são característicos, podendo ser visualizadas lesões do tipo A/E ao diagnóstico histopatológico de partes do íleo (principalmente na junção ileocecal) e cólon. A confirmação da presença de EPEC é feita a partir da cultura de fezes seguida por PCR para identificação dos genes de virulência característicos desse patótipo, principalmente o *eae* (NATARO & KAPER 1998, DEBROY & MADDOX 2001, BLANCHARD 2012).

3.2.3 *Escherichia coli* Produtora da Toxina Shiga (STEC) e Enterohemorrágica (EHEC)

As cepas *E. coli* STEC e *E. coli* EHEC em função do efeito citotóxico em células Vero, se referem a amostras de *E. coli* que produzem pelo menos umas das toxinas Shiga (Stx1 ou Stx2) (GYLES, 2007). Outro fator de virulência importante para a caracterização de EHEC é a presença da ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte effacement*), com genes responsáveis pela formação de A/E, como em EPEC (Figura 3). EHEC inclui amostras de *E. coli* isoladas de seres humanos e de animais e que produzem toxinas Stx e lesão A/E. Já os termos STEC são usados para isolados de bactérias que produzem somente Stx (MAINIL; DAUBE, 2005).

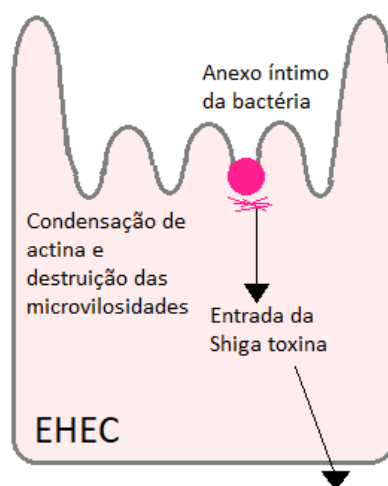


Figura 3. Esquema adesão EHEC e STEC, apresentando destruição das vilosidades por EHEC, devido a lesão A/E, posteriormente entrada das Shiga toxinas devido aos dois patótipos (Bueno, 2010 adaptado)

Grande parte dos bezerros infectados com estes patótipos não apresenta sinais clínicos, entretanto estes animais constituem importantes reservatórios de

STEC/EHEC tanto para bovinos, quanto para os seres humanos (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Isso ocorre porque ruminantes não possuem receptores para Stx no endotélio vascular, mas os mesmos estão presentes nos enterócitos das criptas, linfócitos intraepiteliais e macrófagos da mucosa intestinal.

Infecções por STEC foram atribuídas ao consumo de carne bovina ou de produtos lácteos contaminados com fezes de bovinos (HUSSEIN; SAKUMA, 2005), sendo que, entre os mais de 200 sorotipos de *E. coli* que produzem Shiga toxina, o sorotipo O157:H7 destaca-se pelo alto potencial virulento, sendo o mais frequentemente associado a surtos de toxinfecção de origem alimentar no mundo (VOLD et al., 2000).

3.2.4 *Escherichia coli* necrotoxigênica (NTEC)

Estas cepas de *E. coli* são caracterizadas pela produção de toxinas CNF (fator necrotizante citotóxico) (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1998) que impedem a divisão celular, sem afetar a replicação de ácidos nucléicos. A existência de dois tipos de CNF (CNF1 e CNF2) foi demonstrada em amostras de *E. coli* isoladas de bezerros, leitões e crianças com enterite (DE RYCKE et al., 1990).

Foi realizado o isolamento de CNF1 de amostras colhidas em quadros de diarreia em ruminantes, suínos, cães, coelhos e equinos, de amostras provenientes de quadros septicêmicos em suínos, de infecções no trato urinário e outras infecções extra-intestinais em cães, gatos e seres humanos (VAN BOST et al. 2001a) e já foi encontrada em amostras de *E. coli* isoladas de meningite em crianças (KNUST & SCHMIDT 2010).

Em relação à CNF2, já foi isolada de bovinos, caprinos, equinos e gatos (POHL et al. 1993) e é isolada principalmente de amostras de bezerros com sinal clínico de diarreia, mas também de amostras provenientes de quadros de septicemia, pneumonia, metrite e mastite em bovinos (VAN BOST et al. 2001a). Este patótipo é isolado com mais frequência que o CNF1 (BURNS et al. 1996). Em casos de septicemia, a bactéria pode adentrar a circulação sanguínea e acometer órgãos internos, principalmente os pulmões. À necropsia, Van Bost et al. (2003) observaram congestão da mucosa intestinal, espessamento da mucosa do intestino

delgado e congestão pulmonar. À histopatologia, foram observadas enterocolite, linfadenite, atrofia de vilosidades do intestino delgado e broncopneumonia.

A confirmação da enterite causada por NTEC pode ser realizada pela identificação dos genes codificadores das CNF em isolados bacterianos obtidos de fezes e lesões intestinais ou de outros órgãos, no caso de septicemia, utilizando a técnica de PCR, ou também por meio de testes de citotoxicidade em cultura de células (ORDEN et al., 1999).

3.3 Diagnóstico

A bactéria *Escherichia coli* comumente isolada de fezes, na maioria das vezes, é comensal, não causando doença em seus hospedeiros. Entretanto, existem cepas patogênicas que podem causar quadros de enterite e septicemia (NATARO & KAPER 1998). Desta forma, é necessária a identificação de cepas de *E. coli* causadoras de enterite (NATARO & KAPER 1998, GYLES & FAIRBROTHER, 2010).

O estudo de potenciais reservatórios de genes de virulência e o surgimento de cepas emergentes de *E. coli* requerem a identificação dessas cepas, particularmente as patogênicas, por meio de um grande número de perfis usando testes bioquímicos, microbiológicos e genéticos (KUHNERT et al., 2000a).

3.3.1 Diagnóstico bacteriano

As bactérias *E. coli* produzem colônias de cor rosa em ágar MacConkey (Figura 4) e podem também apresentar atividade hemolítica em ágar-sangue (QUINN et al., 2005). As colônias, em meios nutrientes sólidos em placa, apresentam cerca de 1 a 3 mm de diâmetro, podendo apresentar as formas lisas e rugosas, mas podem existir também colônias com características intermediárias e mucoides. As colônias lisas são convexas e brilhantes, possuem bordos regulares e se dispersam em solução salina a 0,85%, enquanto as rugosas apresentam aspecto e aparência grosseiras, contornos irregulares e dificilmente se dispersam em solução salina (QUINN et al., 2005; BERCHIERI JUNIOR et al., 2009).

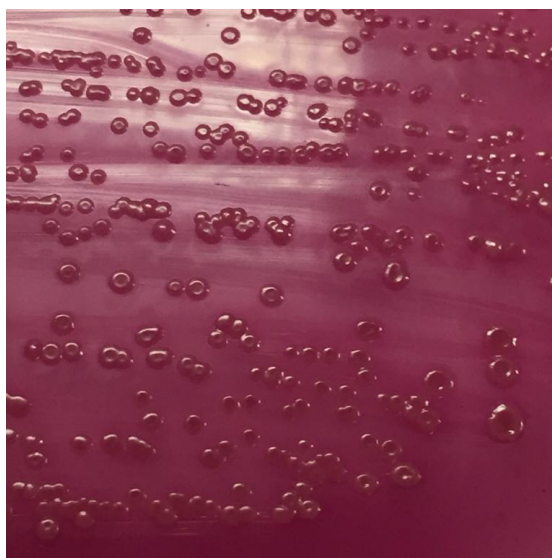


Figura 4. Colônias típicas de *Escherichia coli* em ágar MacConkey. Fonte: Arquivo pessoal.

Caracterizam-se por apresentar metabolismo anaeróbio facultativo, pois possuem metabolismo respiratório e fermentativo, sendo capaz de fermentar, com produção de ácido e gás, a lactose e glicose (meio TSI) (QUINN et al., 2005; ANDREATTI FILHO, 2007). São positivas para as provas de produção de indol e na reação de vermelho de metila (VM) e negativas nos testes de Voges Proskauer (VP) e utilização de citrato. As provas de mobilidade e lisina são positivas, enquanto a oxidase e hidrólise de ureia são negativas (Figura 5) (OLIVEIRA et al., 2004; QUINN et al., 2005; BERCHIERI JUNIOR et al., 2009).

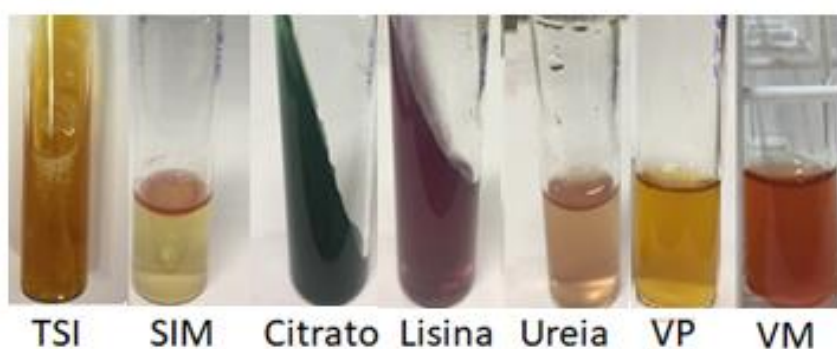


Figura 5. Provas bioquímicas caracterizando o isolado como *Escherichia coli*. Fonte: Arquivo pessoal.

3.3.2 Diagnóstico sorológico

Antes da identificação de fatores de virulência específicos de *E. coli* causadoras de enterite, a sorotipagem era o método mais utilizado para identificar

cepas associadas quadro clínico de diarreia, porém esta é uma técnica que necessita de grande quantidade de materiais, não sendo usual sua utilização.

A determinação dos sorogrupos e sorotipos de *E. coli* pode ser realizada a partir da identificação dos antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) e em alguns casos fimbriais (Figura 6). Eles são importantes para a caracterização de isolados associados às infecções e para estudos epidemiológicos (NATARO & KAPER, 1998).

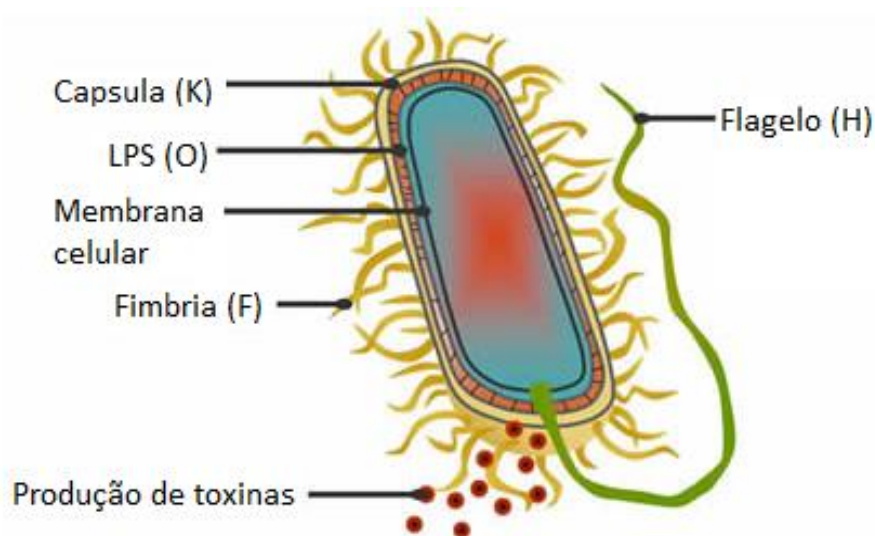


Figura 6. Estrutura antigênica de *E. coli*. Fonte: http://www.ecllab.com/contribute_images/Ecoli_EN.jpg adaptado

O antígeno somático “O” é constituído por uma cadeia de polissacarídeos que se projeta para o espaço extracelular e sua composição é extremamente variável entre as bactérias da mesma espécie. Esta estrutura determina a existência de vários sorogrupos (FERREIRA & KNOBL, 2009).

O antígeno flagelar “H” não é utilizado com frequência na identificação antigênica das cepas de *E. coli*, sendo que a presença de flagelo não tem sido correlacionada com a patogenicidade (BARCELOS, 2005; BERCHIERI JUNIOR et al., 2009).

Os antígenos capsulares K, por sua vez, possuem polissacarídeos capsulares que protegem a membrana externa da parede do ataque do sistema complemento e impedem a fagocitose (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Os antígenos fimbriais (F), estruturas proteicas que se projetam da superfície da bactéria e permitem sua fixação à mucosa intestinal, também são utilizados na

classificação de cepas denominadas enterotoxigênicas (ETEC) (NATARO & KAPER 1998).

Até o momento, são descritos 177 antígenos somáticos, 100 capsulares e 52 flagelares. Existem ainda amostras rugosas, autoaglutinantes, que não podem ser sorotipadas devido à perda parcial ou total da cadeia de polissacarídeo (ROCHA, 2008).

3.3.3 Diagnóstico molecular

Com o avanço da ciência, sabe-se que os produtos gênicos estão mais diretamente associados à patogenicidade da *E. coli*, em relação aos antígenos de superfície. Portanto, avaliar somente a sorotipagem não é suficiente para caracterizar um isolado de *E. coli* como patogênico, embora existam diversas associações entre sorotipos e virulência, bem como entre sorotipos e doenças. Esse fato torna a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a mais indicada para identificação de patótipos (FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2002; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A técnica de PCR é empregada na investigação de patógenos, sendo uma técnica rápida, específica e sensível (NATARO & KAPER 1998, GYLES & FAIRBROTHER 2010).

Esta técnica proporciona a amplificação de uma região selecionada do DNA que permite a detecção de determinado *locus* de virulência. Vários estudos identificaram fatores de virulência em fezes de bezerros com e sem sinal clínico de diarreia através dessa técnica (ANDRADE et al., 2012). Estudos com outras espécies animais, como búfalos (COURA et al., 2019), também foram realizados utilizando a detecção dos genes de virulência através da PCR.

Em Campo Grande-/MS, Salvadori et al. (2003) investigaram a prevalência de fatores de virulência associados à patogenicidade de *E. coli* isolada de bezerros com diarreia, utilizando ensaios fenotípicos e genotípicos, e demonstraram resultados satisfatórios com a utilização da PCR. Eles detectaram 20 (9,75%) isolados apresentando toxina Stx-1, 13 isolados (6,34%) com Stx-2, CNF1 foi identificado em um isolado (0,5%), CNF2 em nove isolados (4,4%), LT-II em 17

amostras (8,3%) e STa em oito (3,9%), demonstrando que esses patótipos podem estar associados a enterite.

Na região Sul do Brasil, Júnior SFV et al. (2017) encontraram fatores de virulência em quatro (26,6%) de 15 amostras de fezes diarreicas e em oito (32%) de 25 amostras não diarreicas. O fator Stx1 (STEC) foi identificado em cinco isolados (12,5%), Eae (EPEC) e Sta em um (2,5%), Eae e F41 em dois (5%) e Eae e Sta em um (2,5%) isolado.

Já em amostras humanas, Costa et al. (2010) demonstraram a diversidade de patótipos de *E. coli* isolados de indivíduos infectados pelo HIV (Human Immunodeficiency Vírus), com predomínio de EIEC e EPEC atípicas, através de sistemas de PCR multiplex, que é uma metodologia econômica e eficiente para rápida triagem e identificação de isolados, dando suporte às atividades de vigilância epidemiológica desenvolvidas pelos institutos de saúde pública.

A classificação dos isolados faz-se necessária para identificar os genes associados à fatores de virulência presentes nas amostras, chegando ao patótipo associado a enterite, sendo que alguns destes apresentam risco à saúde pública. E, como citado, a PCR vem se apresentando como um método rápido e sensível de diagnóstico.

3.4 Resistência antimicrobiana

O tratamento de enterite com antimicrobianos de escolha aleatória nem sempre apresenta bons resultados, enquanto o uso de um antimicrobiano específico pode reduzir a ocorrência de resistência dos micro-organismos (CONSTABLE, 2009). Para tal, são realizados testes de sensibilidade a antimicrobianos com discos impregnados com antibióticos, para verificar a sensibilidade do isolado (BAUER et al., 1966).

É necessário também utilizar um protocolo de dose que atinja e mantenha concentração terapêutica eficaz no local da infecção, tratar por um período adequado, evitar resíduos e efeitos locais ou sistêmicos adversos, e minimizar o potencial para transferência de genes de resistência a antimicrobianos (CONSTABLE, 2009).

Uma vez que a resistência pode ser transferida de animais para humanos, ela se torna ainda mais importante, pois a alta prevalência de multirresistência em amostras de origem animal pode representar um risco para o homem (TROBOS et al., 2009; HUNTER et al., 2010).

A resistência aos antimicrobianos está relacionada não somente ao uso desses, mas também com o notável número de mecanismos genéticos para desenvolvimento de resistência presentes nas bactérias, como a possibilidade de apresentar mutação, manifestar um gene cromossomal, adquirir novo material de resistência genética pela troca direta de DNA por conjugação, por meio de bacteriófago (transdução), através de plasmídeo de DNA (também por conjugação) ou ainda por aquisição de DNA, via transformação (KHACHATRYAN et al., 2005).

A ação dos antimicrobianos é focada em quatro principais mecanismos biológicos: biossíntese da coenzima folato, biossíntese da parede celular, biossíntese de proteína e replicação e reparo de DNA (WALSH, 2003).

Os antimicrobianos de primeira escolha para o tratamento de enterite em bezerros sistematicamente doentes incluem: ampicilina (10 mg/Kg, IM, 12/12h), sulfonamida (25 mg/Kg, IV ou IM, 1X/dia), e amoxicilina oral (10 mg/Kg, 12/12h), podendo esta ser administrada sozinha ou combinada com clavulanato de potássio (12,5 mg/Kg, 12/12h) (CONSTABLE, 2004).

Antimicrobianos de segunda escolha são as cefalosporinas de terceira e quarta geração, como ceftiofur e cefquinoma; e o de terceira escolha é a fluorquinolona (CONSTABLE, 2009).

3.5 Prevenção

Vários métodos visam o controle das enterites, como habitação adequada e higiene, colostragem eficiente e a vacinação da vaca seca (Foster e Smith, 2009).

A separação dos bezerros de suas mães nas primeiras 24 horas é muito comum nos rebanhos leiteiros e pode determinar oferta inadequada de colostro. Estudos demonstram que a administração de colostro de boa qualidade e em quantidade suficiente (10% do peso do bezerro, dividido em duas porções diárias) é uma prática que deve ser recomendada para a prevenção da ocorrência de enterites nos recém-nascidos (MEGANCK et al., 2015).

A vacinação pré-parto de fêmeas no término da gestação constitui medida de manejo eficaz na prevenção da diarreia. As vacinas utilizam bacterinas contendo as fímbrias F5 e F41 que induzem resposta imune humoral anti-F5 e anti- F41 em bezerros lactentes, estimulando a formação de anticorpos e, conseqüentemente, a produção de colostro de maior potencial de proteção (FOSTER & SMITH, 2009).

O local de criação e as práticas de manejo são importantes por influenciarem a incidência de colibacilose. Práticas de criação em gaiolas ou em casinhas, que não permitam o contato entre as terneiras diminui consideravelmente a incidência da doença. Após o nascimento o umbigo tem que ser mergulhado em iodo a 2%; também pode ser amarrado próximo à parede abdominal com fio de algodão. Animais doentes devem ser isolados do restante do grupo e receber tratamento. Em rebanhos de corte, a orientação é de que a área de parição seja bem drenada, seca e para cada par, vaca-bezerro, deve haver um espaço de pelo menos seis metros quadrados, sempre com o cuidado de evitar super lotação na área de parição (SMITH et al., 2004).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFIERI, A. A.; BARRY, A. F.; OTONEL, R. A. A.; ALFIERI, A. F. Rotavíruses. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 844-857.
- ANDRADE G.I., COURA F.M., SANTOS E.L.S., et al. Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**. v. 44, p.1783-1790, 2012.
- ANDREATTI FILHO, L. R. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2007, v. 10.
- AZEVEDO JUNIOR, J.; PETRINI, J.; MOURÃO, G. B. et al. Preweaning Calf Survival of a Nellore Beef Cattle Population. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, 2017.
- BARDIAU, M.; SZALO, M.; MAINIL, J. G. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. **Veterinary Research**, v. 41, n. 5, p. 57, 2010.
- BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis In: SAIF W. M. **Diseases of poultry**. (11ª ed.). Iowa, 2003 p. 138-144.
- BEEKES M, LASCH P, NAUMANN D. Analytical applications of Fourier Transform-Infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. **Veterinary Microbiology**. v. 123, p.305-319, 2007.

- 427 BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA,
428 p.455-469. 2009.
- 429 BLANCHARD P.C. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. **Veterinary Clinics**
430 **of North America: Food Animal Practice**. v .28, p. 443-464, 2012.
- 431 BLANCO, M., BLANCO J. E., MORA A., et al. Distribution and characterization of
432 faecal necrotoxicogenic *Escherichia coli* CNF1 and CNF2 isolated from healthy cows
433 and calves. **Veterinary Microbiology**. v. 59, p. 183-192, 1998.
- 434 BLANCO, J., BLANCO, M., GARABAL, J.I., et al. Enterotoxins, colonization factors
435 and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from humans and animals.
436 **Microbiologia SEM**, v.7, p.57-72, 1991.
- 437 BOTTEON, R. C. C. M.; BOTTEON, P. T. L.; SANTOS JÚNIOR et al. Frequência
438 de diarreia em bezerros mestiços sob diferentes condições de manejo na região do
439 médio Paraíba- Rio de Janeiro e Minas Gerais. **Brazilian Journal of Veterinary**
440 **Research and Animal Science**, v. 45, p. 153-160, 2008.
- 441 BURNS, A.L., BALL, H.J. & FINLAY, D.A. CNF producing *Escherichia coli* isolated
442 from cattle in Northern Ireland. **Veterinary Microbiology**. v.49, p.235-241, 1996.
- 443 CAMPOS, T. A. **Caracterização clonal e biológica de linhagens de *Escherichia***
444 ***coli* de origem aviária**. 125 f. Tese de doutorado - Universidade Estadual de
445 Campinas, Campinas, 2006.
- 446 COSTA A. R. F., LIMA K. V. B., SOUSA C. O., et al. Desenvolvimento de PCR
447 multiplex para a detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli*
448 diarreio gênicas. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v1, p.77–84, 2010.
- 449 CONSTABLE, P.D. Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. **Journal of**
450 **Veterinary Internal Medicine** v. 18, p. 8-17, 2004.
- 451 CONSTABLE, P.D. Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary
452 treatments. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**. v. 25, p. 101-120, 2009.
- 453 COURA, F.M., FREITAS, M.D., RIBEIRO, J. et al. Longitudinal study of *Salmonella*
454 spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from
455 healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health**
456 **Production**, v.47, p. 3-11, 2015.
- 457 Coura, f. m, Diniz, S. A., Silva, M. X. et al. Virulence factors and phylotyping of
458 *Escherichia coli* isolated from non-diarrheic and diarrheic water buffalo calves,
459 **Ciência Rural**, v.49, 2019.
- 460 CROXEN, M. A. & FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli*
461 pathogenicity. **Nature**, v. 8, p. 20-38, 2010.
- 462 DEBROY C. & MADDUX C.W. Identification of virulence attributes of
463 gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. **Animal Health**
464 **Research Reviews**. v. 2, p.129-140, 2001.
- 465 DZIUBA B, BABUCHOWSKI A, NALECZ D, NIKLEWICZ M. Identification of lactic
466 acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. **International Dairy**
467 **Journal**. v.17,183-189, 2007.

- 468 **ECL- The Reference Laboratory for *Escherichia coli*.** Disponível em:
 469 <http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp>. < Acesso em 2 de abril de 2020.
- 470 FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. **Veterinary**
 471 **Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 25, p. 13–36, 2009.
- 472 GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: GYLES C.A., PRESCOTT
 473 J.F., SONGER J.G., THOEN C.O. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*.
 474 Iowa: Wiley-Blackwell. p.231-265, 2010.
- 475 HOLLAND, R. E. et al. Characterization of eae+ *Escherichia coli* isolated from
 476 healthy and diarrheic calves. **Veterinary microbiology**, v. 66, p. 251–263, 1999.
- 477 HUNTER, P.A.; DAWSON, S.; FRENCH, G.L. et al. Antimicrobial-resistance
 478 pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. **Journal of**
 479 **Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. i3-i17, 2010.
- 480 HUSSEIN, H. S.; SAKUMA, T. Invited Review: Prevalence of shiga toxin-producing
 481 *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. **Journal of Dairy Science**, v. 88,
 482 p. 450-465, 2005.
- 483 **IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.** Produção da
 484 Pecuária Municipal. 2018. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/18/0>
 485 < Acesso em 10 de março de 2020>.
- 486 JÚNIOR S.F.V.; CUNHA R.C.; PEREIRA D.I.B.; BOTTON S.Á et al. Identificação
 487 de fatores de virulência de isolados de *Escherichia coli* oriundos de fezes de
 488 bezerros na região Sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 45: 1467, 2017.
- 489 KHACHATRYAN, A.R.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E. et al. Antimicrobial drug
 490 resistance genes do not convey a secondary fitness advantage to calf-adapted
 491 *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, p. 443-448,
 492 2005.
- 493 KNÖBL, T.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.A.; BOTTINO, J.A.; FERREIRA, A.J.P.
 494 occurrence of adhesin-encoding operons in *Escherichia coli* isolated from breeders
 495 with salpingitis and chicks with omphalitis. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.
 496 37, p. 140-143, 2006.
- 497 KNUST, Z. & SCHMIDT, G. Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs): a growing toxin
 498 family. **Toxins** v. 2, p.116-127, 2010.
- 499 KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of
 500 *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **Fems Microbiology**
 501 **reviews**, v. 24, p. 107-117, 2000.
- 502 NATARO J.P. & KAPER J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. **Microbiological**
 503 **Reviews**. v. 11, p.142-201, 1998.
- 504 MAINIL J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and**
 505 **Immunopathology**. v. 152, p.2-12, 2013.
- 506 MEGANCK, V.; HOFACK, G.; PIEPERS, S.; OPSOMER, G. Evaluation of a
 507 protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhoea on dairy herds.
 508 **Preventive Veterinary Medicine**, v. 118, p. 64-70, 2015.

- 509 MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C.; RIBEIRO, T.C.F., et al. Eficácia do Nuflor no
510 tratamento de diarreias em bezerros e leitões. **Hora Vet.**, v. 118, p. 21-24, 2000.
- 511 OLIVEIRA, W.F. et al. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento
512 de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de
513 explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. **RPCV**. v. 99, p. 211-214, 2004.
- 514 ORDEN, J. A et al. Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia*
515 *coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. **Veterinary microbiology**,
516 v. 66, p. 265–73, 1999.
- 517 ORDEN, J. A., D. CID, J. A. RUIZ-SANTA-QUITERIA, S. GARCÍA, S. MARTÍNEZ,
518 R. DE LA FUENTE. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic
519 *E. coli* (EPEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in
520 Spain. **Journal of Applied Microbiology** . v. 93, p. 29-35, 2002.
- 521 PUPIN, R. C.; LEAL, P. V.; PAULA, J. P. L. et al. Cattle diseases in Mato Grosso
522 do Sul, Brazil: a 24-year survey (1995-2018). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.
523 39, p. 686-695, 2019.
- 524 QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C.
525 **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1ª ed. Porto Alegre: editora
526 Artmed, 2005, 512p.
- 527 ROBINS-BROWNE RM, BORDUN AM, TAUSCHEK M, et al. *Escherichia coli* and
528 community acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerging Infectious**
529 **Diseases journal** . v.10, p.1797-805, 2004.
- 530 ROCHA, S.L.S. **Detecção de fatores de virulência de amostras de Escherichia**
531 **coli isoladas de granjas avícolas do RS através do Multiplex-PCR**. 2008. 68 f.
532 Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto
533 Alegre.
- 534 SALVADORI, M.R.; VALADARES, G.F.; LEITE, D.S. et al. Virulence factors
535 of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal**
536 **Microbiology**. v.34, p.230-235, 2003.
- 537 SERIWATANA, J., ECHEVERRIA, P., TAYLOR, D.N., et al. Type II enterotoxin-
538 producing *Escherichia coli* isolated from animals and humans. **Infection and**
539 **Immunity**, v.56, p.1158-1161. 1988.
- 540 SMITH, D. R.; GROTELUESCHEN, D. M.; KNOTT,T.; ENSLEY, S. Prevention of
541 neonatal calf diarrhea with the sandhills calving system. **Proc Am Assoc Bov**
542 **Pract**, v. 37, p. 166-168, 2004.
- 543 SYDOW, A. C. M. D.G. V. **Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em**
544 **estirpes de Escherichia coli em fezes de cães errantes**. 2005. 89 f. Dissertação
545 de Mestrado.Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 546 TROBOS, M.; LESTER, C.H.; OLSEN, J.E. et al. Natural transfer of sulphonamide
547 and ampicillin resistance between *Escherichia coli* residing in the human intestine.
548 **Journal of Antimicrobial Chemoth.** v. 63, p. 80-86, 2009.
- 549 TOMA C, LU Y, HIGA N, NAKASONE N, et al. Multiplex PCR assay for identification
550 of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal Clinical Microbiol.** v.41, p. 2669-
551 2671, 2003.

- 552 TOUBAS D, ESSENDOUBI M, ADT I, et al. FTIR spectroscopy in medical mycology:
553 applications to the differentiation and typing of *Candida*. **Analytical Bioanalytical**
554 **Chemistry**. v. 387, p. 1729-1737, 2007.
- 555 VAN BOST S.; BÂBE M.H.; JACQUEMIN E. et al. Characteristics of necrotoxicogenic
556 *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and
557 1970. **Veterinary Microbiology**. v.82, p.311-320, 2001.
- 558 VAN BOST S.; ROELS S.; OSWALD E. Putative roles of the CNF2 and CDTIII toxins
559 in experimental infections with necrotoxicogenic *Escherichia coli* type 2 (NTEC2)
560 strains in calves. **Microbes and Infection**. v.5, p.1189-1193, 2003.
- 561 VOLD, L.; HOLCK, A.; WASTESON, Y.; NISSEN H. High levels of background flora
562 inhibits growth *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. **International Journal of**
563 **Food Microbiology**. v. 56, p. 219-225, 2000.
- 564 WALSH, C. **Antibiotics: action, origins, resistance**. Washington, DC: ASM
565 PRESS, 2003. 335p.

CAPÍTULO 2

Artigo

(Artigo formatado seguindo as normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE *Escherichia coli* CAUSADORA DE ENTERITE EM BEZERROS

J.F. Tutija¹, C.R.B. Leal²

¹Aluna de pós-graduação - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Campo Grande, MS

²Docente - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Campo Grande, MS

Resumo

Cepas de *Escherichia coli* causadoras de enterite são consideradas importante causa de diarreia em bezerros. Para correta identificação, esses micro-organismos devem ser diferenciados dos membros não patogênicos da microbiota intestinal. As *E. coli* patogênicas podem ser classificadas em cinco patótipos, de acordo com seu mecanismo de patogenicidade, sendo estes: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), produtora da toxina de Shiga (STEC) e necrotoxigênica (NTEC). Este trabalho teve por objetivo caracterizar os isolados de *E. coli* em bezerros, quanto à presença de genes de virulência causadores de enterite no estado de Mato Grosso do Sul e avaliar a sensibilidade dos isolados frente a diferentes antimicrobianos. Foram identificadas bioquimicamente como *E. coli* 176 amostras e realizado antibiograma. Posteriormente, as amostras foram submetidas a PCR e 35 foram positivas para o gene *eae* (19,88%), *stx1* 135 (76,70%), *stx2* 62 das amostras (35,22%), *sta* 159 (90,34%), *ltIII* 35 (19,88%) e para o gene *cnf1* e 2 nenhuma amostra foi positiva. De acordo com esses resultados, os isolados foram identificados em patótipos, sendo 3 EPEC, 32 EHEC, 122 STEC e 163 ETEC. Em relação à sensibilidade antimicrobiana, 77,2% dos isolados foram resistentes a três ou mais grupos farmacológicos, caracterizando-os como multirresistentes, essa multirresistência contribui para a ocorrência de infecções bacterianas resistentes aos antimicrobianos na espécie humana, levando ao alerta para importância da Saúde Única. Esse estudo fornece dados epidemiológicos importantes sobre a doença no estado e no Brasil, e torna relevante a preocupação em relação ao uso indiscriminado de antimicrobianos.

Palavras-chave: diarreia, bovinos, DNA.

Abstract

Escherichia coli strains that lead to enteritis are considered an important cause of diarrhea in calves. For correct identification, these microorganisms must be differentiated from the non-pathogenic members of the intestinal microbiota. Pathogenic *E. coli* can be classified into five pathotypes, according to their pathogenic mechanism, which are: *E. coli* enteropathogenic (EPEC), enterotoxigenic (ETEC), enterohemorrhagic (EHEC), producer of Shiga toxin (STEC) and necrotoxygenic (NTEC). This work aimed to characterize *E. coli* isolates in calves, regarding the presence of virulence genes that cause enteritis in the state of Mato Grosso do Sul and to evaluate the sensitivity of the isolates to different antimicrobials. A hundred seventy six samples were biochemically identified as *E. coli* and antibiogram was performed. Subsequently, the samples were submitted to PCR and 35 were positive for the *eae* gene (19.88%), *stx1* 135 (76.70%), *stx2* 62 of the samples (35.22%), *stx2* 159 (90.34%), *ltII* 35 (19.88%) and for the *cnf1* and 2 gene, no samples were positive. According to these results, the isolates were identified in pathotypes, being 3 EPEC, 32 EHEC, 122 STEC and 163 ETEC. Regarding antimicrobial sensitivity, 77.2% of the isolates were resistant to three or more pharmacological groups, characterizing them as multidrug-resistant, this multidrug resistance contributes to the occurrence of bacterial infections resistant to antimicrobials in the human species, leading to the alert for the importance of Health Only. This study provides important epidemiological data on the disease in the state and in Brazil, and makes the concern regarding the indiscriminate use of antimicrobials relevant.

Key words: diarrhea, cattle, colibacillosis, DNA.

Introdução

Escherichia coli é uma bactéria de importância para neonatos bovinos devido a infecções intestinais e extraintestinais. Cepas desta bactéria são comumente isoladas de fezes, na maioria das vezes são comensais, não causando doença em seus hospedeiros (Nataro; Kaper, 1998). No entanto, existem cepas de *E. coli* patogênicas que são agrupadas de acordo com seus mecanismos de patogenicidade em patótipos, sendo frequentemente associados a doenças e lesões em animais (Barnes *et al.*, 2003; Knöbl *et al.*, 2006; Berchieri Junior *et al.*, 2009). Em bezerros, já foram identificadas cepas de *E. coli* enterotoxigênica

(ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC). Os demais isolados, como *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC), ainda não foram confirmados como causadores de enterite em bovinos (Nataro; Kaper, 1998; Debroy; Maddox, 2001; Gyles; Fairbrother, 2010).

Para confirmação de enterite por *E. coli* é necessária a identificação dos patótipos causadores de enterite. Vários estudos identificaram fatores de virulência em isolados obtidos em fezes de bezerros com e sem sinal clínico de diarreia (Nataro; Kaper, 1998; Gyles; Fairbrother, 2010) por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo uma técnica rápida e sensível (Andrade *et al.*, 2012).

O tratamento de enterite com antimicrobianos nem sempre apresenta bons resultados, mas o uso de um antimicrobiano específico pode diminuir a ocorrência de resistência dos micro-organismos (Constable, 2009). Para tal, são realizados testes de sensibilidade antimicrobianos com discos impregnados com antibióticos, para verificar a sensibilidade do isolado (Bauer *et al.*, 1966).

Uma vez que a colibacilose é uma importante causa de perda econômica em fazendas, são necessários estudos detalhados dos fatores de virulência produzidos por cepas de *E. coli* em animais de criação, pois pouco se sabe se essas cepas são patogênicas ou não, devido principalmente ao método de diagnóstico ser caro e exigir profissionais qualificados. Portanto, este trabalho teve por objetivo caracterizar os isolados de *E. coli* em bezerros, quanto à presença de genes de virulência causadores de enterite e determinar o perfil de resistência a antimicrobianos no estado de Mato Grosso do Sul.

Material e Métodos

Amostras

O presente estudo foi submetido e aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS sob o número 1.002/2018.

Foram coletadas 176 amostras de fezes provenientes de bezerros com um a 60 dias de vida (divididos em duas categorias, um a 30 dias e 31 a 60 dias). As fezes foram analisadas segundo Walker *et al.* (1998), quanto ao aspecto visual macroscópico, à presença de estrias de sangue e classificadas em diarreicas e não diarreicas.

As amostras foram provenientes de quatro macrorregiões de Mato Grosso do Sul, sendo cinco fazendas no município de Campo Grande (20°26'34"S e 54°38'47"W) (39 amostras), uma em Sonora (17°34'37"S e 54°45'28"W) (25 amostras), uma em Rio Verde do Mato Grosso (18°55'05"S e 54°50'39"W) (15 amostras), uma em Rochedo (19°56'55"S e 54°52'49"W) (11 amostras), duas em Água Clara (20°26'53"S e 52°52'41"W) (45 amostras), uma em Chapadão do Sul (18°47'39"S e 52°37'22"W) (15 amostras), uma em Rio Brillhante (21°48'07"S e 54°32'47"W) (15 amostras), e uma em Miranda (20°14'26"S e 56°22'42"W) (11 amostras) (Figura 1). Na amostragem, havia propriedades produtoras de gado de corte (149 amostras) e também de gado de leite (27 amostras). Do total de amostras, 66,47% eram provenientes de cruzamento e 33,5% eram da raça Nelore.

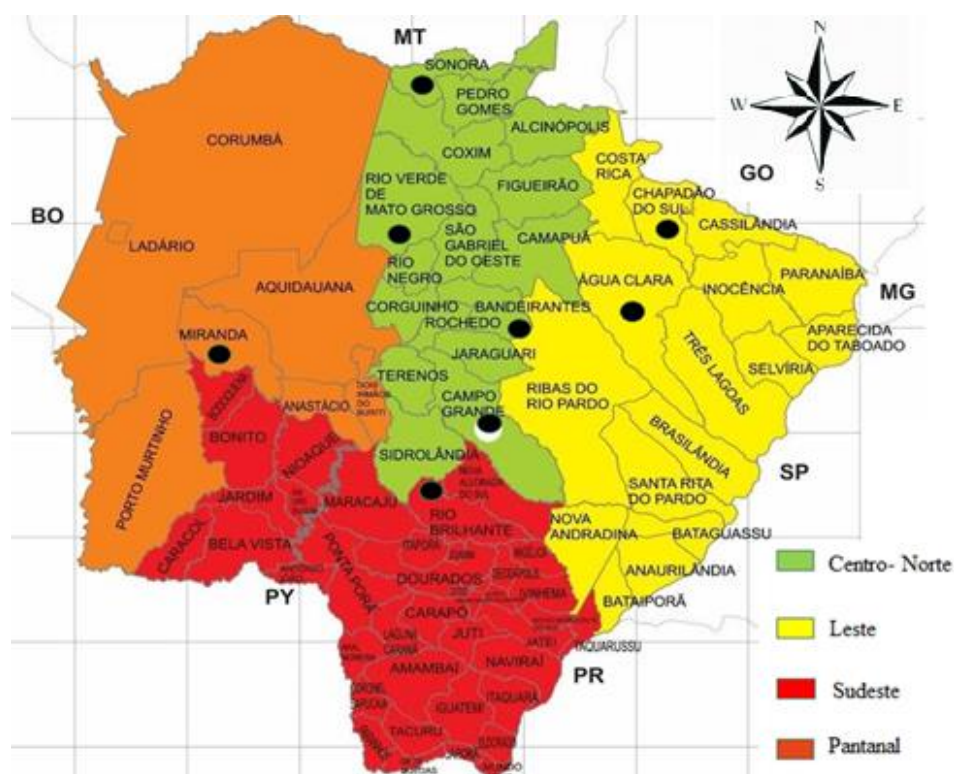


Figura 1. Mapa do estado de Mato Grosso do Sul dividido em macrorregiões, sendo indicada em preto a localização das propriedades amostradas no presente estudo. Fonte: IBGE, SEMAC, 2010. Org. SILVA, L. 2016

As amostras foram coletadas em sacos plásticos diretamente da ampola retal dos animais e mantidas resfriadas (4 °C), ou em swab contendo meio Stuart, por até 48 horas. Em seguida, foram encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Juntamente com as amostras biológicas, foram coletados dados clínicos (sinais clínicos em geral de cada animal) e epidemiológicos (espécie, procedência, idade, entre outros) de cada animal por meio de um questionário (anexo 1).

No laboratório, as amostras foram semeadas em placas contendo ágar MacConkey, sendo incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após o período de crescimento inicial, as amostras provenientes do cultivo foram separadas de acordo com características das colônias e morfotintoriais (coloração de Gram).

Uma bateria de provas bioquímicas específicas para enterobactérias foi realizada, sendo utilizados os meios: ágar TSI (Triplo Açúcar Ferro), SIM (Sulfureto, Indol, Motilidade), Citrato de Simmons, Fenilalanina, Lisina Ferro, caldo Ureia e MRVP (Vermelho de Metila e Voges-Proskauer). Amostras que apresentaram características bioquímicas compatíveis com o gênero *Escherichia coli* realizou-se o antibiograma.

Para o antibiograma, foi utilizado o método de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966) empregando os seguintes antibióticos: florfenicol, tetraciclina, gentamicina, oxacilina, sulfazotrim, penicilina G, norfloxacin, cefalexina, enrofloxacin, cefalotina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico.

Para a análise molecular, foi realizada a extração do DNA; os isolados que estavam em ágar MacConkey foram semeados em caldo BHI (infusão de cérebro e coração) e, após 24 horas, foi realizada sedimentação por centrifugação a 10.000 xg por cinco minutos. A extração de DNA foi realizada a partir do sedimento, segundo protocolo descrito por Araújo *et al.* (2009). A análise da pureza do DNA e quantificação foi realizada em NanoDrop™ OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer.

As reações de PCR para cada gene foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão 10x (20 mM de Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP, 1.25 U de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL), 10 pmol de cada *primer* (100 ng/µL) e 2 µL de DNA (concentração média de DNA 1.113.656 ng/µL). As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial a 94°C por cinco min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto e meio, anelamento a 50/52/ ou 56°C por um minuto e meio e extensão a 72°C por um minuto e meio. Uma etapa de extensão final a 72°C por dez reais foi realizada. Os iniciadores utilizados são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar por PCR fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* de bezerros em Mato Grosso do Sul, Brasil.

Fatores de virulência (genes)	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Produto (pb)	Temperatura de anelamento	Referência
Toxina termoestável (est)	ST-1	CTGTATTGTCTTTTTCACCT	182	56°C	Tornieporth (1995)
	ST-2	GCACCCGGTACAAGCAGGAT			
Toxina temolável (elt)	LT-1	AGATATAATGATGGATATGTATC	300	52°C	SCHULTZS <i>et al.</i> , (1993)
	LT-2	TAACCCTCGAAATAAATCTC			
Intimina (eae)	EAE-1	AAACAGGTGAAACTGTTGCC	454	50°C	Yu (1992)
	EAE-2	CTCTGCAGATTAACCTCTGC			
Toxina Shiga 1 (stx1)	STX-1 ^a	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180	56°C	Paton (1998)
	STX-1B	AGAACGCCCACTGAGATCATC			
Toxina Shiga 2 (stx2)	STX-2 ^a	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255	56°C	Paton (1998)
	STX-2B	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG			
Necrosantes citotóxicos (Cnf)	Cnf 1	GAACCTATTAAGGATAGT CATTATTTATAACGCTG	543	56°C	Blanco et al. (1998)
	Cnf 2	AAT CTA ATT AAA GAG AAC CATTATTTATAAGCGTG	543	56°C	

Os produtos amplificados foram analisados após eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com GelRed®, e as imagens foram registradas com auxílio de sistema de fotodocumentação.

Os isolados de *E. coli* foram classificados em patótipos conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação dos patótipos de *Escherichia coli* de acordo com o gene de virulência (Costa et al., 2010).

Categorias patogênicas	Genes de virulência característicos
EPEC	<i>eae</i> (intimina) com ausência de <i>stx</i>
ETEC	<i>elt</i> (<i>ltII</i>) e/ou <i>est</i> <i>sta</i> (enteroxinas)
EHEC	<i>stx1</i> ou <i>stx2</i> e <i>eae</i> (intimina)
STEC	<i>stx1</i> e/ou <i>stx2</i>

Na análise estatística, os resultados foram avaliados com associação entre os patótipos e caracteres epidemiológicos (raça, sexo, coloração e aspecto das fezes) por meio de análise de variância no programa SAS®, em que os dados binomiais foram transformados em porcentagem e realizado o Glimmix no programa. Para o antibiograma e regiões avaliadas, foi utilizada a análise descritiva.

Resultados

Dos 176 animais, 149 (84,65%) apresentaram fezes desde pastosas a líquidas com ou sem a presença de sangue e foram caracterizadas como diarreicas, e 27 (15,34%) não apresentavam diarreia. Em todas as amostras de fezes foram isoladas colônias bacterianas, as quais foram identificadas bioquimicamente como *Escherichia coli* (glicose +, lactose +, H₂S -, motilidade +, Indol +, citrato -, lisina ferro +, presença de gás, ureia -, vermelho metila + e voges- proskauer -).

Após análises bacteriológicas, as 176 amostras tiveram seu DNA analisado por meio da técnica de PCR para detecção de sete genes de virulência (Figura 2).

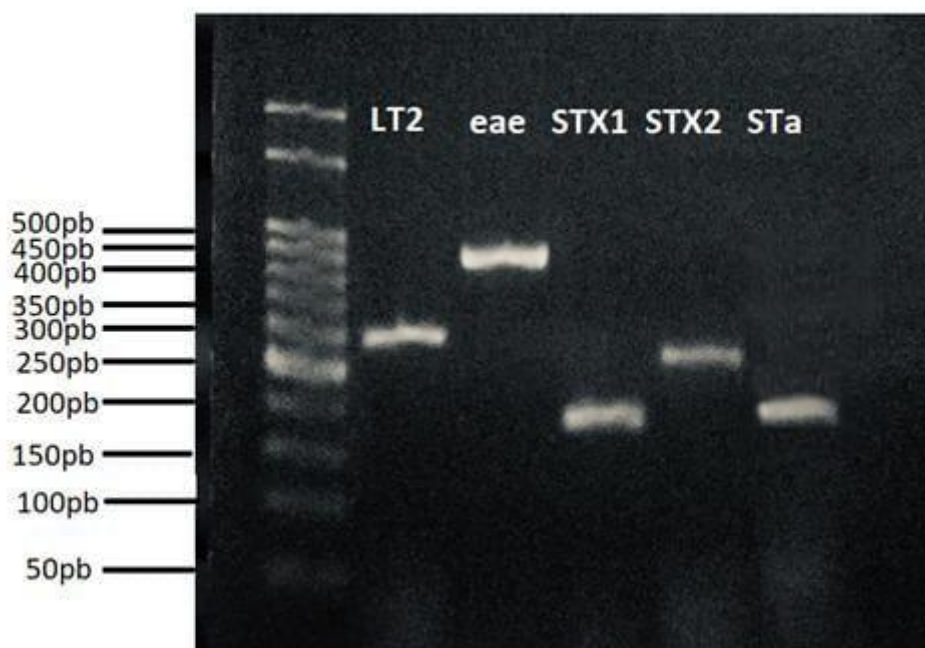


Figura 2. Eletroforese de amostras positivas em gel de agarose 2% utilizando marcador molecular de 50 pares de base, com visualização de bandas de genes de virulência (*lt2*, *eae*, *stx1*, *stx2* e *sta*)

De acordo com esses resultados, os patótipos encontrados foram classificados conforme a tabela 3.

Em todas as propriedades (rurais) observou-se com maior frequência o patótipo ETEC (92,61%), seguido de STEC (63,63%) e EHEC (18,18%), com exceção da propriedade do município de Sonora que não apresentou nenhuma cepa de EHEC. O patótipo EPEC foi encontrado com menor frequência (1,13%), sendo descrito em apenas duas propriedades com uma amostra positiva em cada, localizadas em Água Clara e Rio Verde de Mato Grosso. Um único isolado não apresentou nenhum patótipo, sendo o isolado proveniente de um animal com diarreia. Houve também casos em que apareceram mais de dois patótipos por isolado, com maior frequência de ETEC + STEC (61,93%), seguido de ETEC + EHEC (15,34%) e ETEC + EPEC (1,13%).

Tabela 3. Classificação em patótipos dos isolados de *E. coli* obtidos no presente estudo quanto ao perfil dos genes de virulência encontrados.

Genes de virulência	Número de isolados	Patótipo
<i>eae + ltII</i>	2	EPEC + ETEC
<i>ltII</i>	1	ETEC
<i>sta</i>	20	ETEC
<i>ltII + sta</i>	5	ETEC
<i>eae + stx1 + sta</i>	7	EHEC + ETEC
<i>eae+stx1+sta+ltII</i>	3	EHEC + ETEC
<i>eae+stx1+stx2+sta+ltII</i>	4	EHEC + ETEC
<i>eae+ stx2+ sta</i>	1	EHEC + ETEC
<i>eae+ sta+ stx1+ tx2</i>	12	EHEC+ ETEC
<i>stx1 + stx2</i>	3	STEC
<i>stx1</i>	5	STEC
<i>stx2</i>	3	STEC
<i>stx1 + sta</i>	56	STEC + ETEC
<i>stx2 + sta</i>	1	STEC + ETEC
<i>sta+ stx1 +stx2</i>	34	STEC + ETEC
<i>stx1+ ltII+ sta</i>	9	STEC + ETEC
<i>stx2+ltII+sta</i>	2	STEC + ETEC
<i>stx1 +stx2+ sta+ltII</i>	7	STEC + ETEC

Após análise estatística, observou-se associação significativa entre o patótipo STEC e a raça nelore ($p= 0,0065$). Não foi observada associação entre a presença do patótipo em relação a idade, sexo, aspecto e coloração das fezes.

Após a realização do antibiograma, 3,40% dos isolados apresentaram resistência a um grupo de antimicrobianos e 77,2% foram resistentes a três ou mais grupos, caracterizando-os como multirresistente (Magiorakos et al., 2012). Os resultados do perfil de suscetibilidade dos 176 isolados de *Escherichia coli* oriundos de fezes de bezerros, com e sem diarreia, estão demonstrados na figura 3.

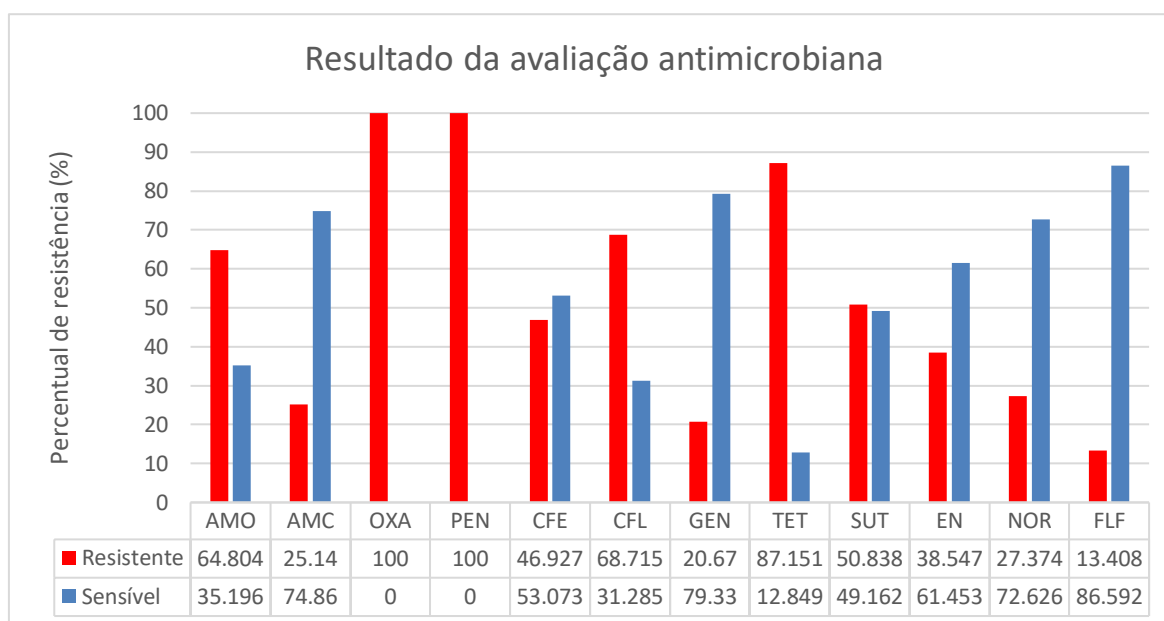


Figura 3. Resultados da avaliação de sensibilidade antimicrobiana. Antibióticos: AMO: amoxicilina e AMC: amoxicilina + ácido clavulânico. OXA: oxacilina, PEN: penicilina G, CFE: cefalexina, CFL: cefalotina, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina, SUT: sulfazotrim EN: enrofloxacina, NOR: norfloxacina, FLF: florfenicol.

A multirresistência foi observada em maior percentual nos patótipos ETEC (71,02%), STEC (50%) e por último EHEC (12,5%).

Discussão

Em bovinos, ETEC é o patótipo encontrado com maior frequência (Rigobelo et al., 2006). No presente estudo, em 92,61% dos isolados foi identificado esse patótipo, sendo que 90,34% dos isolados foram positivos para *sta*; 15,34% para *sta* +, e somente 2,27% para *lt* II. Resultados semelhantes foram descritos por Hirish (2003) que, ao analisarem outros tipos de amostras, como isolados de alimentos, também relataram que estirpes que produzem somente ST (enterotoxinas termoestáveis) são as mais comuns, seguidas por aquelas que secretam tanto ST como LT (enterotoxinas termolábeis) e depois por aquelas que secretam somente LT. Nossos resultados para o gene *sta* foram superiores aos relatados por Lazaro et al. (1994), Salvadori et al. (2003) e Rigobelo et al., (2006). Em relação ao gene *lt*II, Salvadori et al. (2003) encontraram 8,3% em isolados de *E. coli*, resultado inferior aos dos isolados de *E. coli* aqui descritos.

No presente estudo, os animais tinham até 60 dias, sendo o patótipo ETEC encontrado com maior frequência em animais até uma semana de vida (Foster & Smith 2009, Blanchard 2012), porém não foi observada associação em relação a idade e este patótipo.

Diversos pesquisadores encontraram esse patótipo em bezerros com mais de uma semana de idade (Guüler et al. 2008, Bartels et al. 2010, Coura 2011, Andrade et al. 2012). A razão da restrição da infecção por ETEC à primeira semana de idade dos bezerros não é totalmente conhecida. Uma das justificativas é que os receptores para as fímbrias são mais expressos em células imaturas das vilosidades intestinais. Assim, a maturação intestinal pós-natal limita a infecção por ETEC em bezerros com menos de uma semana de idade (Blanchard 2012).

Em humanos, ETEC é uma das principais causas de enterite em viajantes e crianças com menos de cinco anos (Rigobelo et al., 2006). Em 2010, um estudo da Global Burden of Disease (GBD) estimou a mortalidade anual por doenças devido a ETEC em 157.000 mortes - 9% de todas as mortes atribuídas à enterite e aproximadamente 1% de todas as mortes em crianças de 28 dias a cinco anos (Lozano et al., 2012), muitos dos casos associados a intoxicações alimentares em escolas (Pakalniskiene et al. 2006). Em 138 isolados de bovinos de corte houve identificação de ETEC (96,29%) e em 26 isolados de leite (92,61%). Portanto, tanto a ingestão de carne bovina, quanto a ingestão de leite podem gerar risco à população por carregarem esse patótipo, especialmente quando houver o consumo desses alimentos sem processamento adequado.

Em relação às STEC, as taxas de colonização em rebanhos bovinos são variadas, podendo chegar a 60%, mas as taxas típicas variam de 10 a 25% (Tristão et al., 2007). Em alguns casos (Urdhal et al. 2003), elevadas frequências de STEC foram encontradas em fezes de ovinos (87,6%) e bovinos (64,6%) na Noruega, achados semelhantes aos do presente estudo, em que os genes *stx1* e *stx2* estiveram presentes em 68,18% dos isolados. Este fato gera preocupação, pois as STEC são isoladas usualmente de animais sadios (Ferreira et al., 2018), como no presente estudo, em que 6,25% dos isolados eram provenientes de bezerros sem sinal clínico de diarreia. Isso ocorre devido ao fato de os ruminantes não possuírem receptores para Stx no endotélio vascular, por isso sinais sistêmicos não são observados (Mainil 2013). Os 93,75% dos isolados que apresentavam STEC, em animais com diarreia, podem ser atribuídos às associações dos patótipos STEC+ ETEC, sendo, portanto, a sintomatologia causada por ETEC.

No presente estudo, em 4,54% dos isolados foram positivos para EHEC, os animais também não apresentavam sinais clínicos, porém também existiam animais sintomáticos. Uma explicação para isso é que os animais afetados por EHEC apresentam lesões A/E e não

somente por *stx* (DebRoy & Maddox 2001, Gyles & Fairbrother 2010). Em um estudo sobre a prevalência de *E. coli* O157 em porcos e bovinos, os animais que abrigavam esses isolados eram assintomáticos, enquanto os seres humanos apresentavam casos de diarreia (Ateba et al., 2008). Esse patótipo pode provocar colite hemorrágica (diarreia com sangue), e complicações adicionais que resultam na síndrome hemolítica urêmica (SHU) potencialmente fatal (Momtaz et al., 2012).

Em relação a EPEC, nosso estudo encontrou apenas 1,13% dos isolados positivos, sendo este o segundo menos presente. Esse patótipo é um patógeno intestinal que causa quadro de enterite aguda e persistente em animais e seres humanos (Kleta, 2014). No Brasil, *E. coli* enteropatogênica é um dos principais micro-organismos responsáveis por enterite em crianças até um ano de idade (Gomes et al., 1991; Scaletsky et al., 2001). Pereira et al. (2014), ao analisarem amostras fecais de vacas leiteiras do Estado de São Paulo, encontraram somente o gene *eae* em 5,6%, demonstrando as baixas taxas desse isolado.

Não foi identificado nenhum dos isolados como NTEC, pois as amostras foram negativas tanto para Cnf1, quanto para Cnf2. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos, como o de Salvadori et al. (2003) que, ao analisar 205 isolados, encontraram Cnf1 em um (0,5%) e Cnf2 em nove isolados (4,4%). Já segundo Mahanti et al. (2014), de 336 isolados, sete (1,9%) foram positivos, o que demonstra a baixa prevalência desse patótipo nos rebanhos. Em relação ao único isolado em que não houve a presença de nenhum patótipo, mas o animal apresentava diarreia, esta pode ocorrer devido a outros agente, como vírus, protozoários e bactérias que não foram pesquisados.

A disseminação desses patótipos entre os rebanhos domésticos de ruminantes pode causar preocupações adicionais relacionadas ao surgimento e à disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos, em resposta ao amplo uso dessas moléculas para tratar doenças infecciosas em animais jovens (Bogaard e Stobberingh, 2000).

O padrão de resistência mais comum foi a oxacilina e penicilina (100%), resultados que corroboram os achados de Shahrani, Dehkordi e Momtaz (2014), que após avaliação do perfil de resistência de STEC provenientes de bezerros com diarreia, também encontraram 100% de resistência a penicilina. Segundo Nepomuceno et al. (2016), *E. coli* é naturalmente resistente a penicilina G, portanto, é comumente esperado uma alta resistência.

O terceiro antibiótico ao qual os isolados apresentaram maior resistência foi a tetraciclina, com 87,15%, resultados semelhantes aos de Costa et al. (2006) e Franco et al. (2010) em estudos com suínos, cuja resistência observada foi de 88,6% e 70,6%, respectivamente. Após o questionário epidemiológico, observou-se que todas as propriedades relataram já ter utilizado a tetraciclina em algum momento durante o manejo.

O antibiótico ao qual as bactérias apresentaram maior sensibilidade foi o florfenicol (86,5%). Variações entre sensibilidade e resistência podem ocorrer de acordo com fatores relacionados à população bacteriana existente e ao uso indiscriminado de antimicrobianos (Lazaro et al, 1994; Mota et al., 2000). Sato et al. (2015) em um estudo com isolados de leitões encontraram resistência em 95,2%. Já em um estudo realizado por Mota et. Al (2000) observou-se índices de sensibilidade de 85% frente a esse fármaco.

Existem evidências que mostram que o uso de antimicrobianos na medicina veterinária contribui para a ocorrência de infecções bacterianas resistentes aos antimicrobianos na espécie humana, o que alerta para a importância da Saúde Única (Bogaard e Stobberingh, 2000; Mota et al., 2005; Trobos et al., 2009).

Determinar a prevalência dos genes de virulência em uma população ajuda a direcionar o médico veterinário a realizar o manejo adequado nas propriedades, assim como verificar se a causa da enterite tem relação com *Escherichia coli*, já que esses quadros entéricos podem ocorrer por diversos fatores. Além disso, a determinação da prevalência pode diminuir a incidência de doenças em humanos.

Outra preocupação considerada foi em relação às cepas multirresistentes que compuseram a maior parte dos isolados, devendo-se alertar os médicos veterinários a utilizarem os antimicrobianos com cautela. No trabalho em questão, não foi indicada a escolha de penicilina, oxacilina e tetraciclina, que foram os antibióticos mais utilizados nas propriedades e que apresentaram maior grau de resistência. Uma alternativa é utilizar o antibiograma em casos de surtos ou após a identificação da patogenicidade da cepa isolada, para diminuir perdas econômicas decorrentes do uso desses medicamentos.

O estudo demonstrou que, em bezerros com diarreia, até 60 dias de vida, no estado do Mato Grosso do Sul, houve predomínio do patótipo ETEC nos isolados de *E. coli* e estes demonstraram multirresistência aos antibióticos comumente utilizados no tratamento dessa enfermidade.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/MEC, Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ-RJ e Universidade Federal de Santa Maria- UFSM.

Referências

- ANDRADE G.I., COURA F.M., SANTOS E.L.S.; et al. Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, v. 44: p.1783-1790, 2012.
- ARAUJO, F.R.; RAMOS, C.A.N.; LUIZ, H.L. et al. **Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2009. 120p. (Comunicado Técnico, n.5).
- ATEBA C.N., MBEWE M.; BEZUIDENHOUT C.C..Prevalência e cepas de *Escherichia coli* O157 em bovinos, suínos e humanos na Província Noroeste, África do Sul. *Revista Sul Africana de Ciências*, v.104, p. 7 – 8, 2008.
- BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis In: SAIF W. M. **Diseases of poultry**. (11^a ed.). Wiley-Blackwell Iowa, 2003, 1260p.
- BAUER A. W., KIRBY W. M. M., , SHERRIS. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, p.493–496, 1966.
- BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, p.455-469. 2009.
- BLANCO M., BLANCO J.E., MORA A.; et al. Prevalence and characteristics of necrotoxigenic *Escherichia coli* CNF1+ and CNF2+ in healthy cattle. *Research in Microbiology*, v. 149, p.47-53, 1998.
- BOGAARD VAN. DEN., STOBBERINGH E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.14 , p. 327-335, 2000.

- 920 DEBROY C. & MADDOX C.W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal
921 *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Animal Health Research Reviews*, v. 2,
922 p.129-140, 2001.
- 923 DONNENBERG M.S.; GIRÓN J.A., NATARO J.P., KAPER J.B. A plasmid-encoded type
924 IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence.
925 *Molecular Microbiology*. v. 6, p.3427-37, 1992.
- 926 FERREIRA, M. R. A.; STELLA, A. E.; FREITAS-FILHO, E. G. et al. Distribution of the
927 stx1 and stx2 genes in *Escherichia coli* isolated from milk cattle according to season, age,
928 and production scale in southwestern region of Goiás, Brazil. *Arquivo Brasrasileira de*
929 *Medicina Veteterinária e Zootecnia*, v.70, p.1807-1813, 2018.
- 930 FLORFENICOL, VETERINARY-SYSTEMIC. The United States Pharmacopeial
931 Convention. p.6, 2007.
- 932 FOSTER, D. M. & SMITH, G. W. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Veterinary*
933 *Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.25, p.13-36, 2009.
- 934 GOMES, M. J. P.; IRINO, K.; GUTH, B. E. C.; ANDRADE, J. R. C. Virulence markers and
935 genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111
936 isolated from cattle. *Veterinary Microbiology*. V. 119, p. 358-365, 2007.
- 937 GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: GYLES C.A., PRESCOTT J.F.,
938 SONGER J.G., THOEN C.O. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa: Wiley-
939 Blackwell. p.231-265, 2010.
- 940 HIRSH, D. C. *Escherichia*. In: HIRSH, D. C.; ZU, Y. C. Microbiologia Veterinária. Rio de
941 Janeiro, p.63-68, 2003.
- 942 KNÖBL, T.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.A.; et al. Occurrence of adhesin-encoding
943 operons in *Escherichia coli* isolated from breeders with salpingitis and chicks with
944 omphalitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.37, p.140-143, 2006.
- 945 LOZANO R., NAGHAVIO M., FOREMEN, K., et al. Global and regional mortality from
946 235 causes of death for 20 age-groups in 1990 and 2010: a systematics analysis for the global
947 burden of disease study 2010. *Lancet*, v.380, p. 2095-2128, 2012.
- 948 MAINIL J. *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and*
949 *Immunopathology*. v.152, p.2-12, 2013.
- 950 NATARO J.P. & KAPER J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical*
951 *Microbiology*, v. 11, p.142-201, 1998.

- 952 PAKALNISKIENE J., FALKENHORST G., LISBY M., et al. A foodborne outbreak of
 953 enterotoxigenic *E. coli* and *Salmonella* Anatum infection after a high-school dinner in
 954 Denmark. *Epidemiology and Infection*. v. 137, p. 396-401, 2009.
- 955 PAL A., GHOSH S., RAMAMURTHY T.; et al. Shiga-toxin producing *Escherichia coli*
 956 from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta, India. *Indian Journal of Medical*
 957 *Research*, v. 110, p.83-85, 1999.
- 958 PATON, A. W.; PATON, J. C.; GOLDWATER, P. N., et al. Direct detection of *Escherichia*
 959 *coli* shiga-like toxin genes in primary fecal cultures using the polymerase chain reaction.
 960 *Journal Clinical Microbiology*. v. 31, p.3063–3067, 1993.
- 961 PEREIRA, M. C. S.; RIGUEIRO, A. L. N.; ONO, R. K.; RIGOBELLO, E. C. Avaliação dos
 962 padrões de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* portadoras e não
 963 portadoras dos genes stx1, stx2 e eae. *Revista Acadêmica Ciências Agrárias Ambientais*, v.
 964 12, n. 4, p. 270-276, 2014.
- 965 RIGOBELLO E.C., GAMEZ H.J., MARIN J.M., et al Virulence factors of *Escherichia coli*.
 966 isolated from calves with diarrhea. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*,
 967 v. 58, p. 305-310, 2006.
- 968 SCHULTSZ, C., POOL, G.J., van KETEL, R., et al. Detection of enterotoxigenic
 969 *Escherichia coli* in stools samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA
 970 probes and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, p.2393-2397,1994.
- 971 TORNIEPORTH N.G., JOHN J., SALGADO K.; et al. Differentiation of pathogenic
 972 *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.
 973 33, p.1371-1374, 1995.
- 974 TRISTÃO, L. C. S.; GONZALEZ, A. G. M.; COUTINHO, C. A. S. et al. Virulence
 975 markersand genetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from
 976 serogroup O111 isolated from cattle. *Veterinary Microbiology*, v.119, p. 358-365, 2007.
- 977 URDHAL, A. M.; BEUTIN, L.; SKJERVE, E.; ZIMMERMANN, S.; WASTESON, Y.
 978 Animal host associated differences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated
 979 from sheep and cattle on the same farm, *Journal of Applied Microbiology*, v.95, p.92-101,
 980 2003.
- 981 WALKER, P. G. et al. A reliable, practical, and economical protocol for inducing diarrhea
 982 and severe dehydration in the neonatal calf. *Canadian journal of veterinary research*, v. 62,
 983 p. 205, 1998.

984 YU J., KAPER J.B. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic
985 *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology*, v. 6, p. 411-7.

986

987

988

09/07/2019

SEI/UFMS - 1345667 - Resolução



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

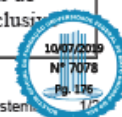


RESOLUÇÃO Nº 59, DE 09 DE JULHO DE 2019.

A PRESIDENTE DO COLEGIADO DE CURSO DOS CURSOS DE MESTRADO E DOUTORADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais, resolve, **ad referendum**:

Aprovar os projetos dos mestrands referentes à disciplina "Projetos", a qual foi ofertada no primeiro semestre de 2019, conforme constam na tabela abaixo:

Orientador	Aluno	Título do Projeto
Breno Fernandes Barreto Sampaio	Julia Lourenço Bitencourt	Análise comparativa da utilização do plasma rico em plaquetas autólogo e ozonizado, no tratamento de endometrites em éguas
Cássia Rejane Brito Leal	Juliane Francielle Tutija	Identificação de escherichia coli diarreicogênicas em bezerros através caracterização molecular e espectroscopia por infravermelho
Eric Schmidt Rondon	Alisson Santos Reginaldo	Determinação da concentração plasmática de minerais em cães portadores de Leishmania infantum oriundos do município de Campo Grande/MS
Eric Schmidt Rondon	Pedro Sant'Ana de Camargo	Efeitos da osmolaridade e da ozonização sobre a formação de aderências abdominais e a cicatrização
Fernando de Almeida Borges	Zelina dos Santos Freire	Resistência de rhipicephalus (boophilus) microplus contra acaricidas comercialmente disponíveis no Brasil
Fernando Paiva	Fernanda Paula Fernandes dos Santos Veloso	Caracterização de antígenos totais de nematodos gastrintestinais pela resposta imune humoral de bovinos naturalmente infectados
Mariana Isa Poci Palumbo	Bets-Saba Naate Naumann Cerqueira Leite	Avaliação seriada das alterações clínicas, laboratoriais e eletrocardiográficas em felinos domésticos com obstrução uretral
Ricardo Antônio Amaral de Lemos	Carolina de Castro Guizelini	Sistema integrado de diagnóstico em doenças de bovinos: do sinal clínico ao diagnóstico conclusivo



https://sei.ufms.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=1707948&infra_sistema=1

09/07/2019

SEI/UFMS - 1345667 - Resolução

ELIANE VIANNA DA COSTA E SILVA



Documento assinado eletronicamente por Eliane Vianna da Costa e Silva, Presidente de Colegiado, em 09/07/2019, às 09:01, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1345667 e o código CRC A3ADAD86.

COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.005137/2019-14

SEI nº 1345667



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Identificação dos genes de virulência de *Escherichia coli* em diarreia de bezerros”, registrada com o nº 1.002/2018, sob a responsabilidade de **Cássia Rejane Brito Leal** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 10ª reunião ordinária do dia 08/11/2018.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	07/01/2019 a 15/12/2020
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Bos indicus</i>
Nº de animais	150 Machos + 50 Fêmeas = 200
Peso/Idade	60 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Fazendas de Produção/MS

Joice Stein

Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 13 de novembro de 2018.



Documento assinado eletronicamente por Joice Stein, Professor do Magisterio Superior, em 19/11/2018, às 13:19, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0881866 e o código CRC 94F2F979.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.042535/2018-22

SEI nº 0881866

993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- LABAC

Questionário Epidemiológico

Responsável pelo preenchimento: _____

Proprietário: _____ Cel. _____ email _____

Propriedade _____ Região: _____

• Propriedade:

Área total da propriedade (hectare; alqueire):

Tipo de sistema de produção desenvolvido na propriedade () cria () recria () engorda

Raças (Quais)? Faz cruzamento industrial? (Qual)?

Qual o tipo de pastagem? (predominante) _____

Qual sistema de pastejo utilizado? Quantidade e área média dos piquetes? Tempo de permanência em cada piquete? _____

Fonte de fornecimento de água?

() Poço Artesiano () Córrego () Nascente dentro da fazenda () Nascente fora da fazenda.

Forma de Fornecimento de água?

() Pilhetas () Direto da Fonte.

Faz limpeza das pilhetas? Com que frequência? _____

Já enviaram amostras para diagnóstico laboratorial?

() Sim () Não Quais ? Quando?

1033 Ingesta de colostro é acompanhada? () Sim () Não Usa banco de colostro ou equivalente? Se
 1034 sim, Qual?

1035 _____

1036 • **BEZERROS:**

1037 Qual origem dos animais? () Compra (Fazenda e Leilão) () Própria da fazenda

1038 ✓ Manejo dos bezerros:

1039 Início dos nascimentos: _____

1040 Qual Idade dos bezerros ao desmame: _____

1041 É realizada a antissepsia umbilical? Como é realizada? _____

1042 _____

1043 É realizada a aplicação de algum medicamento após nascimento? Qual? _____

1044 _____

1045 ✓ Sanidade:

1046 Sinais clínicos observados:

() Febre	() Mucosas Pálidas	() Hálito Urêmico	() Mialgia
() Diarreia	() Emagrecimento	() Apatia	() Icterícia
() Letargia	() Esplenomegalia	() Edema Submandibular	() Anorexia
() Outros	() Outros	() Outros	() Outros

1047

1048 Em que período iniciaram os casos? _____

1049 Houve óbitos? Quantos? _____

1050 Qual tempo transcorrido entre o aparecimento dos sinais clínicos e a morte dos animais? _____

1051 _____

1052 ✓ Diarreia:

1053 Animais apresentam diarreia com quantos dias após o nascimento? _____

1054 Qual aspecto das fezes? Qual coloração das fezes?

1055 _____

1056 _____

1057 Foi realizado tratamento? Como ? _____

1058 Qual critério de escolha do tratamento ? _____

1059 Houve melhora após o tratamento? _____

1060 Os animais são vacinados? Quais são elas e quando são realizadas?

VACINA	MARCA	PERÍODO
() Brucelose		3 a 8 meses ()S ()N
() Febre Aftosa		()Planalto ()Cerrado
() Raiva		
() Clostridiose		
() IBR		
() BVD		
() Leptospirose		
() Colibacilose		
() Outros		

1061

1062 **Artigo 1:** Formatado conforme as normas do periódico: Arquivo Brasileiro de
 1063 Medicina Veterinária e Zootecnia, disponível no link:

1064 <http://www.scielo.br/revistas/abmvz/iinstruc.h>