

Caracterização molecular de isolados de *escherichia coli* em casos de diarreia neonatal bovina**Molecular characterization of *escherichia coli* isolates in cases of bovine neonatal diarrhea**

DOI:10.34117/bjdv6n6-545

Recebimento dos originais: 08/05/2020

Aceitação para publicação: 24/06/2020

Rosana Klaus

Especialista em Clínica de Ruminantes pela Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Capão do Leão, Departamento de Clínicas Veterinária, Pelotas - RS, Brasil -
96160-000 – Prédio do NUPEEC

E-mail: rosanaklaus94@gmail.com

Karen Cruz Freitas

Graduanda em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Capão do Leão, Departamento de Clínicas Veterinária, Pelotas - RS, Brasil -
96160-000 – Prédio do NUPEEC

E-mail: 8karenfreitas@gmail.com

Rutiele Silveira

Graduanda em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Capão do Leão, Departamento de Clínicas Veterinária, Pelotas - RS, Brasil -
96160-000 – Prédio do NUPEEC

E-mail: silveirarutiele@gmail.com

Antônio Amaral Barbosa

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Capão do Leão, Departamento de Clínicas Veterinária, Pelotas - RS, Brasil -
96160-000 – Prédio do NUPEEC

E-mail: antoniobarbosa.vet@hotmail.com

Rubens Alves Pereira

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Laboratório Ibase

Endereço: Campus Capão do Leão, Departamento de Clínicas Veterinária, Pelotas - RS, Brasil -
96160-000 – Prédio do NUPEEC

E-mail: rubens_ap@yahoo.com.br

Cássio Cassal Brauner

Professor Adjunto no Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: na Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Capão do Leão, Departamento de Clínicas Veterinária, Pelotas - RS, Brasil - 96160-000 – Prédio do NUPEEC

E-mail: cassiocb@gmail.com

Marcio Nunes Corrêa

Professor Titular no Departamento de Clínicas Veterinária na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Capão do Leão, Departamento de Clínicas Veterinária, Pelotas - RS, Brasil - 96160-000 – Prédio do NUPEEC

E-mail: marcio.nunescorrea@gmail.com

Viviane Rohrig Rabassa

Professora Adjunta no Departamento de Clínicas Veterinária na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Campus Capão do Leão, Departamento de Clínicas Veterinária, Pelotas - RS, Brasil - 96160-000 – Prédio do NUPEEC

E-mail: vivianerabassa@gmail.com

RESUMO

A *E. coli* caracteriza-se como o agente etiológico mais diagnosticado em casos de diarreia neonatal bovina, todavia esta bactéria nem sempre é a causadora da enfermidade, tendo em vista que alguns sorovares possuem fatores de virulência não capazes de causar a doença. Sendo assim o objetivo do corrente estudo foi identificar genes de virulência de diferentes sorovares de *E. coli* presentes em amostras de fezes de bezerras acometidas por diarreia, através da técnica de PCR. Foram acompanhadas 14 bezerras diarreicas da raça Holandês. A partir do diagnóstico de diarreia, eram realizadas coletas de fezes nos dias 0 e 7 onde era realizado isolamento e identificação do agente bacteriano e posterior extração do DNA genômico dos isolados e caracterização genotípica através da reação em cadeia de polimerase (PCR). A partir do cultivo microbiológico das fezes, foi possível a identificação de *Escherichia coli* em 100% (n=17) das amostras coletadas. Através da análise de PCR, foram identificados genes de hemolisina (*hlyA*) em 32,35% das amostras, 8,82% foram positivas para produtoras de toxina shiga (*stx1*), 8,82% apresentavam o gene intimina (*eae*), 8,82% apresentavam a toxina termoestável A (*est1A*) e ainda 41,19% das amostras foram negativas para esses genes pesquisados (não patogênicas). Diante do exposto, fica evidente a importância do conhecimento dos sorovares e fatores de virulência que caracterizam a patogenia da diarreia de bezerros de modo a compreender a epidemiologia, a manifestação clínica e o diagnóstico correto.

Palavras chave: Bovinos, Sorovares, Tipificação.

ABSTRACT

E. coli is characterized as the most diagnosed etiological agent in cases of bovine neonatal diarrhea, however this bacterium is not always the cause of the disease, given that some serovars have virulence factors that are not capable of causing the disease. Thus, the aim of the current study was to identify virulence genes from different *E. coli* serovars present in stool samples from calves affected by diarrhea, using the PCR technique. 14 Holstein diarrheal calves were followed. From the diagnosis of diarrhea, feces were collected on days 0 and 7, where isolation and identification of the bacterial

agent was carried out and subsequent extraction of genomic DNA from the isolates and genotypic characterization through the polymerase chain reaction (PCR). From the microbiological cultivation of feces, it was possible to identify *Escherichia coli* in 100% (n=17) of the collected samples. Through PCR analysis, hemolysin (*hlyA*) genes were identified in 32.35% of the samples, 8.82% were positive for shiga toxin producers (*stx1*), 8.82% had the intimin (*eae*) gene, 8.82% had thermostable toxin A (*estA*) and yet 41.19% of the samples were negative for these researched (non-pathogenic) genes. Given the above, it is evident the importance of knowledge of serovars and virulence factors that characterize the pathogenesis of calf diarrhea in order to understand the epidemiology, the clinical manifestation and the correct diagnosis.

Key words: Cattle, Serovars, Typification.

1 INTRODUÇÃO

A diarréia neonatal bovina é uma enfermidade crítica presente nos rebanhos que afeta o bem-estar, traz prejuízos com o tratamento e atrasa o desenvolvimento do animal afetando a vida reprodutiva futura, além de ser causa significativa de mortalidade de bezerras (AGHAKESHMIRI; AZIZZADEH, 2017). Pode ser causada por diversos patógenos como bactérias (*Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis* sorotipo *Dublin*), vírus (*rotavírus* e *coronavírus*) e protozoários (*Cryptosporidium* spp. e *Eimeria* spp.) (CHO et al., 2013), sendo a maioria por infecções mistas. Entretanto, a bactéria *E.coli* destaca-se por ser um importante patógeno em animais jovens, podendo causar infecções intestinais e septicêmicas (STELLA, 2009).

A identificação do agente etiológico é embasada no isolamento do microrganismo nas fezes ou conteúdo intestinal através de cultura e caracterização microbiológica, detecção de genes de virulência por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) para classificação dos patótipos presentes (COURA et al., 2014). A tipificação molecular e classificação das estirpes de *E.coli* é importante por sua relevância, possibilitando identificar as cepas e diferenciá-las em comensais e diarréiogênicas. Estas distinguem-se quanto aos fatores de virulência que cada patótipo apresenta, classificando-as em *E.coli* enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigênica (ETEC) e *E.coli* produtora da toxina Shiga (STEC) (NATARO; KAPER, 1998; MARTINEZ; TRABULSI, 2008).

Dessa forma, no presente estudo o objetivo foi identificar genes de virulência de diferentes patótipos de *E.coli* presentes em amostras de fezes de bezerras acometidas por diarréia, através da técnica de PCR.

2 METODOLOGIA

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais CEUA-UFPEL: 10/2018, sendo realizado em uma propriedade leiteira no sul do Rio Grande do Sul, Brasil (32° 16' S, 52° 32' E). Foram acompanhadas 14 bezerras da raça Holandês mantidos em sistema

intensivo de produção, estando todos sob as mesmas condições de manejo, alocados em um galpão suspenso com baias individuais, desde o nascimento até 10 dias de idade.

O diagnóstico de diarreia se baseou pelo exame clínico aliado ao escore de fezes seguindo a metodologia de McGuirk (2008), com os escores 2, 3 e 4 caracterizados por fezes diarreicas. A partir do diagnóstico de diarreia, eram realizadas coletas de fezes nos dias 0 e 7, para a realização de culturas microbiológicas com o propósito de isolamento e identificação do agente bacteriano no Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) e posteriormente encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DCTA) para extração do DNA genômico dos isolados e caracterização genotípica através da reação em cadeia de polimerase (PCR). Ainda, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Parasitologia – LADOPAR, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) no dia em que era identificada a doença para exames coproparasitológicos os quais tiveram resultado negativo.

A partir do cultivo microbiológico das fezes, foi possível a identificação de *Escherichia coli* em 100% (n=17) das amostras coletadas. A confirmação molecular dos isolados de *E. coli* foi realizada por PCR, o gene *uspA* foi utilizado para confirmação de espécie e gênero, gerando um fragmento de 884 pares de base (pb).

Nos isolados confirmados, foram pesquisados por PCR os genes de virulência *eae* (384 pb), *stx1* (180 pb), *hlyA* (534 pb) e *est1a* (157 pb), que codificam para a intimina, presente nos patótipos enteropatogênica (EPEC) e na *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), toxina *Stx1* (presente em STEC), hemolisina, presente na enterohemorrágica (EHEC) e toxina termoestável A, presente na enterotoxigênica (ETEC). Os *primers*, condições e referências utilizadas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos *primers* e condições utilizados para identificação de genes de virulência utilizadas neste estudo.

Gene	Sequência de primers	TA	NC	T°A	Ref.
<i>uspA</i>	F CGATACGCTGCCAATCAGT	884	30	70	Chen; Griffiths, 1998
	RACGCAGACCGTAGGCCAGAT				
<i>eae</i>	F ACCCGGCACAAGCATAAGC	384	35	60	Paton; Paton, 1998
	R CACCTGCAGCAACAAGAGG				
<i>stx1</i>	FATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180	35	60	Paton; Paton, 1998
	RAGAACGCCCACTGAGATCATC				

<i>hlyA</i>	FGCATCATCAAGCGTACGTTCC RAATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	35	60	Paton; Paton, 1998
<i>estla</i>	FCCTCTTTTAGCAGACACTGAATCATTG RCAGGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG	157	30	63	Muller et al., 2007

TA: Tamanho do *amplicon* (pb); NC: Número de ciclos; T°A: Temperatura de anelamento (°C); Ref.: Referências.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise de PCR, foram identificados genes de hemolisina (*hlyA*) em 32,35% das amostras, 8,82% foram positivas para produtoras de toxina shiga (*stx1*), 8,82% apresentavam o gene intimina (*eae*), 8,82% apresentavam a toxina termoestável A (*estla*) e ainda 41,19% das amostras foram negativas para esses genes pesquisados (não patogênicas), tais genes são característicos, respectivamente, de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), produtora da toxina Shiga (STEC), enterotoxigênica (ETEC) e enteropatogênica (EPEC). Heller e Chigerwe (2018) relatam que há diversos patotipos de *E. coli* envolvidos nas patogenias da diarreia neonatal, cujos principais patovares são a EHEC, STEC e ETEC, sendo predominante a partir do quarto dia de vida (FOSTER; SMITH, 2009).

Segundo Andrade e colaboradores (2012), a presença de STEC e EHEC varia de 2,7% até mais de 50%, sendo descritos para ETEC percentuais de 0 até 30%, no vigente estudo tais patovares representaram 8,82%, 32,35% e 8,82% dos isolados, respectivamente, dados similares foram encontrados por Ok et al. (2009).

No presente estudo, a maior ocorrência foi do gene *hlyA*, esse codifica a hemolisina, um dos fatores de virulência mais importantes de EHEC. Pode-se presumir a presença desse patotipo, visto que atua na patogênese da diarreia, através de mecanismos de adesão induzindo alterações pró-inflamatórias e consequentemente dano celular (BADOUEI et al., 2016). Além disso, três dessas linhagens também apresentavam o gene *stx1*, responsável pela produção de toxina Shiga. Resultado semelhante foi detectado no estudo de Lorenze et al. (2013), que mostrou significativa associação da hemolisina à presença de *stx* e *eae*.

A produção de toxina Shiga é o principal fator de virulência da STEC atuando na patogênese de algumas doenças em humanos e também na diarreia de bezerros neonatos (ALTERTHUM; TRABULSI, 2015), esta estirpe possui caráter zoonótico, assim como a EPEC e EHEC, onde os bovinos são considerados reservatórios do agente (CROXEN et al., 2013). Sua patogênese ocorre a partir da endocitose mediada por um receptor de membrana, que após a internalização da *stx* provoca

a inibição da síntese proteica, resultando em apoptose da célula alvo (COURA et al., 2014). A patogênese das infecções por STEC são geralmente multifatoriais ocorrendo de forma sinérgica com outros fatores de virulência, o que contribui com manifestações clínicas mais graves (ALTERTHUM; TRABULSI, 2015).

Neste trabalho, alguns dos isolados com a presença do gene *stx1*, também apresentaram o gene *eae*, o qual codifica para a intimina, responsável por colonizar a mucosa intestinal através de um mecanismo de adesão, induzindo a uma lesão histopatológica característica denominada *attaching and effacing* (A/E), provocando a destruição das microvilosidades intestinais levando a um quadro de diarreia secretora e severa má absorção (ALTERTHUM; TRABULSI, 2015; BADOUEI et al., 2016).

Essa lesão A/E também é característica de *E. coli* enteropatogênica, considerando que um dos isolados apresentou um dos genes que caracteriza este patotipo, a intimina (*eae*) e não apresentou a presença do gene *stx1*, dessa forma pode-se presumir a presença desse patotipo (CAINE et al, 2014). No entanto, o gene *stx2*, que também codifica para a Shiga toxina 2 não foi pesquisado no presente estudo.

Houveram também isolados apresentando a toxina termoestável A, caracterizando o patotipo ETEC, que acomete bezerros, principalmente aos 3 e 4 dias de vida (FOSTER; SMITH, 2009; BLANCHARD, 2012). Esse patotipo caracteriza-se por colonizar a superfície da mucosa intestinal e produzir enterotoxinas termoestáveis (ST) e termolábeis (LT) que alteram as funções dos enterócitos, aumentando a secreção e reduzindo a absorção de líquidos (COURA et al., 2014).

Apesar de não ter sido pesquisada neste estudo, outra estirpe diarreiogênica é a *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), responsável por casos de diarreia em humanos, mas também já sendo relatada em cães e bovinos (MANCHESTER et al., 2013; SHABANA, 2014). A patogênese da EIEC ocorre com a invasão nos enterócitos, produção de enterotoxinas e indução de macrófagos à apoptose após a fagocitose, entretanto quadros diarreicos por EIEC têm sinais clínicos leves que se tornam autolimitantes. De acordo com Croxen et al. (2013), este é subnotificado em pesquisas epidemiológicas, por algumas cepas apresentarem similaridade com a bactéria *Shigella* spp., enquanto outras apontam características de *E. coli* comensais.

Como visto no presente trabalho, foi significativo o percentual de isolados que não apresentaram os genes de virulência pesquisados, classificadas como *E. coli* genérica, uma vez que muitas vezes as bactérias isoladas das fezes de bezerros diarreicos são comensais da flora intestinal, não sendo responsáveis pela patogênese da diarreia (COURA et al., 2014). No entanto, em animais debilitados ou com alterações na barreira gastrointestinal, patovares não patogênicos de *E. coli* presentes no intestino podem acarretar infecção (CONSTABLE, 2009). Desta forma, seriam

necessárias mais pesquisas genóticas para afirmar que estas não possuem um patotipo definido, visto que são diversos os genes de virulência presentes nos diferentes patotipos de *E. coli*.

4 CONCLUSÃO

Diante do exposto, fica evidente a importância do conhecimento dos sorovares e fatores de virulência que caracterizam a patogenia da diarreia de bezerros de modo a compreender a epidemiologia, a manifestação clínica e o diagnóstico correto. Ainda assim, são necessários mais estudos para identificar estirpes comensais de *E. coli* que podem estar envolvidas na patogenia da diarreia neonatal bovina.

REFERÊNCIAS

- AGHAKESHMIRI, F.; AZIZZADEH, M.; FARZANEH, N.; GORJIDOOZ, M. (2017). Effects of neonatal diarrhea and other conditions on subsequent productive and reproductive performance of heifer calves. *Veterinary Research Communications*. 41. 10.1007/s11259-017-9678-9.
- ALTERTHUM, C.L.; TRABULSI, L. R. *Microbiologia*. 6st ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte: Editora Atheneu; 2015. 920p.
- ANDRADE, S. F. *Manual de terapêutica veterinária*, 2^a ed. cap. 3. p.23. ed. Rocca. São Paulo. 2012.
- BADOUEI, M. A.; MORABITO, S.; NAJAFIFAR, A.; MAZANDARANI, E. Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin gene (EHEC-hlyA)-harboring isolates from cattle reveals a diverse origin and hybrid diarrheagenic strains. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016; 39, 342-348.
- BLANCHARD, P. C. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*. 2012; 28(3): 443-464.
- CAINE, L. A; NWODO, U.; OKOH, A.; NDIP, R.; GREEN, E. Occurrence of virulence genes associated with diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw cow's milk from two commercial dairy farms in the Eastern Cape Province, South Africa. *International journal of environmental research and public health*. 2014; 11(11), 11950-11963.
- CHEN, J.; GRIFFITHS, M. W. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Letters in Applied Microbiology*. 1998; 27(6):369-71.

CHO, Y-II.; HAN, J-Ik.; WANG, C.; COOPER, V.; SCHWARTZ, K.; ENGELKEN, T.; YOON, K.J. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Veterinary Microbiology*, v. 166, p. 375–385, 2013.

COURA, F.M.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B. Patótipos de *Escherichia coli* causadores de diarréia em bezerros: uma atualização. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 34(9):811-818, setembro, 2014.

CONSTABLE, D. P. Treatment of Calf Diarrhea: Antimicrobial and Ancillary Treatments. *Veterinary Clinics Food Animal*. 2009; 25:101-120.

CROXEN, M. A.; LAW R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013; 26(4):822-880. doi:10.1128/CMR.00022-13.

FOSTER, D. M; SMITH, G. W. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*. 2009; 25:13-36.

HELLER, M. C.; CHIGERWE, M. Diagnosis and Treatment of Infectious Enteritis in Neonatal and Juvenile Ruminants. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*. 2018; 34(1): 101-117.

LORENZE, S. C; SON, I.; MAOUNOUNEN-LAASRI, A.; LIN, A.; FISCHER, M.; KASE, J. A. Prevalence of hemolysin genes and and comparison of ehxA subtype patterns in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and non-STEC strains from clinical, food, and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol*. 2013; 79 (20), 6301–6311.

MANCHESTER, A. C.; HILL, S.; SABATINO, B.; ARMENTANO, R.; CARROLL, M.; KESSLER, B.; MILLER, M.; DOGAN, B.; MCDONOUGH, S. P.; SIMPSON, K. W. Association between Granulomatous Colitis in French Bulldogs and Invasive *Escherichia coli* and Response to Fluoroquinolone Antimicrobials. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 56–61, 2013.

MARTINEZ, M. B.; TRABULSI, L. R. Enterobacteriaceae. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F., editores. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu; 2008. p. 271-9.

MCGUIRK, S. M. Disease management of dairy calves and heifers. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2008; 24(1):139-153.

MUELLER, D.; GREUNE, L.; HEUSIPP, G.; KARCH, H.; FRUTH, A.; TSCHÄPE, H.; SCHMIDT, M. A. Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73(10):3380 – 3390.

NATARO J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998 Jan;11(1):142-201.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb O111 and rfbO157. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36(2):598-602.

OK, M.; GÜLER, L.; TURGUT, K.; OK, Ü.; ŞEN, I.; GÜNDÜZ, I. K.; BIRDANE, M. F.; GÜZELBEKTEŞ, H. (2009), The Studies on the Aetiology of Diarrhoea in Neonatal Calves and Determination of Virulence Gene Markers of *Escherichia coli* Strains by Multiplex PCR. *Zoonoses and Public Health*, 56: 94-101.

SHABANA, I. (2014). *Escherichia coli* pathotypes associated with diarrhea in human and domestic animals. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 9. 155-161.

STELLA, A. E. Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. *Microbiologia* (Madrid), 2009.