

Fernanda Morcatti Coura

Caracterização molecular de *Escherichia coli* isoladas de bovinos, bubalinos e aves.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação

Curso: Ciência Animal

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Marcos Bryan Heinemann

Co-orientador: Andrey Pereira Lage.

BELO HORIZONTE

ESCOLA DE VETERINÁRIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2016

C858c Coura, Fernanda Morcatti, 1986-
Caracterização molecular de *Escherichia coli* isoladas de bovinos, bubalinos e aves /
Fernanda Morcatti Coura. – 2016.
101 p. : il.

Orientador: Marcos Bryan Heinemann

Co-orientador: Andrey Pereira Lage

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Animais domésticos – Doenças – Teses. 2. *Escherichia coli* – Teses. 3. Diarreia em Animais – Teses. I. Heinemann, Marcos Bryan. II. Lage, Andrey Pereira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.


CDD – 636.089 693

FOLHA DE APROVAÇÃO

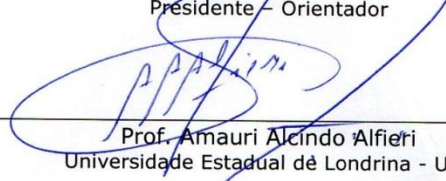
FERNANDA MORCATTI COURA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.


Aprovada em 24 de Fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:




Prof. Marcos Bryan Heinemann
Presidente - Orientador



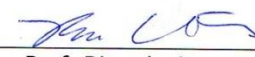
Prof. Amauri Alcindo Alfieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL



Prof. Alessandro de Sá Guimarães
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA



Profª. Juliana Pinto da Silva Mol
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Ricardo Augusto Dias
Universidade de São Paulo- USP



Dedico esse trabalho

Aos meus pais, irmãos,

Noivo, mestres e

A todos os animais

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre em minha vida, iluminando o meu caminho e me protegendo.

Aos meus pais, Lucy e Fernando, pelo exemplo, compreensão e amor incondicional.

Aos meus irmãos, Luciana e Rafael, pelo apoio e companheirismo.

Ao meu noivo, Peterson, pela paciência, presença constante e cumplicidade.

Ao meu orientador, Prof. Marcos Bryan Heinemann, pela oportunidade, sabedoria e amizade.

Ao professor Andrey, pelo carinho e ensinamentos.

Aos professores Marcos Xavier, Lobão e Último, pela amizade e ensinamentos.

À Soraia, pela paciência e ajuda nas análises estatísticas.

Ao Dr. Moxley, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe na Universidade de Nebraska-Lincoln, nos EUA.

Aos amigos, colegas de curso e amigos dos laboratórios, principalmente os amigos do LBA, pelos momentos e conhecimentos compartilhados, amizade e torcida.

Aos funcionários do DMVP/EV/UFGM, pelos conselhos e apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro ao projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de Bolsa pelo programa Institucional Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

*“We must have perseverance
And above all confidence in
Ourselves. We must believe that
We are gifted for something”*

Marie Curie

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO GERAL	15
HIPÓTESES	16
OBJETIVOS	16
1. CAPÍTULO 1: PATOTIPOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> CAUSADORES DE DIARREIA EM BEZERROS: UMA ATUALIZAÇÃO.....	17
1.1. RESUMO.....	17
1.2. INTRODUÇÃO	17
1.3. PATOTIPOS DE <i>E. COLI</i> CAUSADORES DE DIARREIA EM BEZERROS.....	22
1.3.1. <i>E. COLI</i> ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC).....	22
1.3.2. <i>E. COLI</i> ENTEROPATOGÊNICA (EPEC).....	24
1.3.3. <i>E. COLI</i> ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC) E <i>E. COLI</i> PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC).....	25
1.3.4. <i>E. COLI</i> NECROTOXIGÊNICA (NTEC).....	28
1.4. ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS BRASIL.....	30
1.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
1.6. REFERÊNCIAS	32
2. CAPÍTULO 2: DETECÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ISOLADAS DE FEZES DE BEZERROS COM E SEM DIARREIA.....	39
2.1. RESUMO.....	39
2.2. INTRODUÇÃO	39
2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.3.1. AMOSTRAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> E CARACTERIZAÇÃO.....	45
2.3.2. TIPAGEM FILOGENÉTICA.....	48
2.3.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
2.3.4. PROTOCOLO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	51
2.4. RESULTADOS.....	51
2.5. DISCUSSÃO.....	55
2.6. REFERÊNCIAS	57
CAPÍTULO 3: DETECÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ISOLADAS DE FEZES DE	

BEZERROS BUBALINOS (<i>BUBALUS BUBALIS</i>) COM E SEM DIARREIA EM MINAS GERAIS.....	64
3.1. RESUMO.....	64
3.2. INTRODUÇÃO.....	64
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
3.3.1. AMOSTRAS.....	67
3.3.2. EXAME BACTERIOLÓGICO.....	68
3.3.3. EXTRAÇÃO DE DNA E IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA POR PCR.....	68
3.3.4. DETERMINAÇÃO DOS FILOGRUPOS DE <i>E. COLI</i>	69
3.3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
3.3.6. PROTOCOLO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	69
3.4. RESULTADOS.....	69
3.5. DISCUSSÃO.....	73
3.6. REFERÊNCIAS.....	76
4. CAPÍTULO 4: DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE AMOSTRAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ISOLADAS DE CARCAÇAS DE AVES SEM ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS E CONDENADAS POR SUSPEITA DE COLIBACILOSE.....	82
4.1. RESUMO.....	82
4.2. INTRODUÇÃO.....	82
4.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	84
4.3.1. COLETA DE AMOSTRAS E ANÁLISE BACTERIANA.....	84
4.3.2. EXTRAÇÃO DE DNA E DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO.....	85
4.3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	85
4.4. RESULTADOS.....	85
4.5. DISCUSSÃO.....	87
4.6. REFERÊNCIAS.....	89
5. CAPÍTULO 5: COMPARAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE AMOSTRAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ISOLADAS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS.....	93
5.1. RESUMO.....	93
5.2. INTRODUÇÃO.....	93
5.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	95
5.3.1. AMOSTRAS E DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DE <i>E. COLI</i>	95
5.3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	96
5.4. RESULTADOS.....	96
5.5. DISCUSSÃO.....	97

5.6. REFERÊNCIAS	99
CONCLUSÕES GERAIS	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Principais características dos patótipos de <i>E. coli</i> causadores de diarreia em bezerros	20
Tabela 2.1. Fator de virulência, sequências de nucleotídeos dos primers utilizados, tamanho de fragmento amplificado esperado, temperatura de anelamento para iniciadores utilizados e referência bibliográfica.	47
Tabela 2.3: Genótipos e etapas necessárias para a atribuição de <i>Escherichia coli</i> a um filogrupo (Adaptado de CLERMONT et al., 2013).....	50
Tabela 3.1: Identificação dos filogrupos de <i>E. coli</i> isoladas de fezes diarreicas e normais de bezerros bubalinos em Minas Gerais, Brasil.	72
Tabela 4.1: Distribuição dos filogrupos de amostras <i>Escherichia coli</i> isoladas de carcaças de frango normais e condenadas ao abate.	86
Tabela 4.2. Distribuição dos filogrupos de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de coração, fígado e trato respiratório de carcaças de frango de corte ao abate.....	86
Tabela 5.1: Distribuição dos filogrupos de <i>E. coli</i> de acordo com o animal doméstico analisado.	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representação esquemática da interação entre as células epiteliais intestinais com os principais patótipos de <i>E. coli</i> associados a diarreia em bezerros. A. ETEC – <i>E. coli</i> enterotoxigênica; ETEC aderem aos enterócitos e produzem toxinas termolábeis (LT) ou termoestáveis (ST). B. EPEC – <i>E. coli</i> enteropatogênica; EPEC aderem aos enterócitos e causam lesões A/E, alterando a arquitetura das microvilosidades. C. EHEC – <i>E. coli</i> enterohemorrágica; STEC – <i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga; EHEC e STEC aderem aos enterócitos e produzem toxinas Shiga, sem absorção e alteração sistêmicas; A indução de lesões A/E por EHEC é a característica que as diferenciam de STEC. D. NTEC – <i>E. coli</i> necrotoxigênica; NTEC se aderem aos enterócitos e produzem toxinas CNF1 ou CNF2 que induzem a desaminação de membros da família das Rho GTPases, resultando na ativação permanente dessas proteínas.	21
---	----

Figura 2.1: Fatores de virulência de amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de fezes normais e diarreicas de bezerros em Minas Gerais, Brasil. As linhas indicam a classificação em patotipos. * EAST-1: amostras positivas para EAST-1 somente.	52
Figura 2.2: Distribuição dos patotipos de <i>E. coli</i> isolados de fezes normais e diarreicas de bezerros de acordo com a faixa etária.....	53
Figura 2.3: Análise de Correspondência para as categorias analisadas. A representação bidimensional explica 93,46% de variação total, com 55,06% explicada pela primeira dimensão, 26,21% pela segunda dimensão e 12,19% pela terceira dimensão.....	54
Figura 3.1: Número de amostras, fatores de virulência e patotipos de <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras fecais diarreicas e não diarreicas de bezerros bubalinos com até 90 dias de idade em Minas Gerais. * * Amostras de <i>E. coli</i> com fatores de virulência que não permitem a classificação em patotipo foram classificadas como "outros".....	70
Figura 3.2: Número de amostras de acordo com patotipo de <i>E. coli</i> identificado em amostras fecais diarreicas e não diarreicas nos três grupos de idade dos bezerros bubalinos.	71
Figura 3.3: Análise de Correspondência para as categorias analisadas. Patotipo e filogrupo que são semelhantes são plotados perto no gráfico. A representação bidimensional explica 94,55% da variação total, com 47,68% explicada pela primeira dimensão, 26,63% pela dimensão segunda e 20,63% pela terceira. O valor da terceira dimensão é mostrado entre parênteses.	73
Figura 4.1. Análise de Correspondência para as categorias analisadas. A representação bidimensional explica 42,52% da variação total, com 15,59% explicada pela primeira dimensão, 13,86% pela dimensão 2st e 13,07% no terceiro. O valor de uma terceira dimensão é mostrado entre parênteses.	87
Figura 5.1: Análise de Correspondência para as categorias tipo de hospedeiro e filogrupo de <i>E. coli</i> . O gráfico bidimensional explica 100% da variação total, com 83,38% explicada pela primeira dimensão e 16,62% pela segunda dimensão.....	97

RESUMO

Patotipos de *Escherichia coli* se destacam como importante enteropatógenos envolvidos na síndrome diarreica. Amostras de *E. coli* patogênicas são classificadas em patotipos, de acordo com a presença de fatores de virulência e mecanismos pelos quais causam doença. Já foram identificados cinco patotipos de *E. coli* associados à diarreia em bezerros: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC). No presente estudo, amostras de *E. coli* isoladas de fezes de bezerros bovinos e bubalinos e carcaças de frangos foram estudadas. A análise filogenética de 336 estirpes de *E. coli* isoladas de fezes de bezerros bovinos mostrou que 21 (6,25%) pertencem ao filogrupo A, 228 (67,85%) ao filogrupo B1, 2 (0,6%) ao filogrupo B2, 5 (1,49%) ao filogrupo C, 57 (16,96%) ao filogrupo E e 3 (0,9%) ao filogrupo F. O filogrupo D não foi identificado e vinte amostras (5,95%) foram designadas como filogrupo "desconhecido". Somente ETEC foi associada com a presença de diarreia ($P = 0,002$) e não houve associação entre o grupo filogenético de *E. coli* e a presença de diarreia ($P = 0,164$). A análise de correspondência mostrou que EHEC e STEC são classificados principalmente como filogrupo B1, EAEC (EAST-1) filogrupo A, ETEC e EPEC filogrupo E. Duzentos e dezessete amostras de *E. coli* foram isoladas de fezes de bezerros bubalinos. Os patotipos identificados em fezes diarreicas foram ETEC (2/84), NTEC (16/84), STEC (20/84), EPEC (3/84), EHEC (3/84), e EAEC (33/84). E em fezes não diarreicas foram NTEC (21/50), STEC (17/50), EHEC (1/50), e EAEC (7/50). Fezes de animais com 1 a 30 dias de idade tiveram maior frequência de *E. coli* positivas para os fatores de virulência ($P = 0,094$). Patotipo EAEC (EAST-1) ($P = 0,008$) e filogrupo C ($P = 0,03$) foram associados com a presença de diarreia. A análise dos filogrupos de *E. coli* mostrou que 58,95% pertenciam ao filogrupo B1, seguidos dos filogrupos E (9,70%), B2 (5,9%), C (5,9%), D (5,22%), A (2,24%) e F (1,50%). Amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frangos com aparência normal liberadas para consumo e carcaças condenadas por colibacilose em um matadouro com Serviço de Inspeção Federal no estado de Tocantins foram analisadas. Cento e trinta e sete amostras de *E. coli* foram obtidas após isolamento e identificação bioquímica. Oitenta e quatro amostras de *E. coli* foram isoladas de carcaças de frangos de corte condenados, dos quais 11 foram isoladas do coração, 7 do fígado e 66 do trato respiratório. Das 53 amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frangos normais, 5 foram isoladas de coração, 4 de fígado e 44 de trato respiratório. Os filogrupos A seguido por B1 foram os filogrupos mais comuns de *E. coli* isoladas de carcaças de frangos saudáveis, enquanto os filogrupos B1 seguido por A foram os mais comuns em carcaças de frangos condenadas. Os filogrupos B2, C, D, E e F foram os menos comuns. Foi estudada também a distribuição dos grupos filogenéticos de 529 amostras de *Escherichia coli* isoladas das três espécies animais. A frequência dos filogrupos foi: A = 15,31%, B1 = 60,49%, B2 = 2,46%, C = 4,35%, D = 2,46%, E = 12,29% e F = 2,64%. Os filogrupos A ($P < 0,001$) e F ($P = 0,002$) foram associados com *E. coli* isoladas de aves, os filogrupos B1 ($P < 0,001$) e E ($P < 0,001$) com *E. coli* isoladas de bovinos, e os filogrupos B2 ($P < 0,001$) e D ($P = 0,007$) com *E. coli* isoladas de búfalos. Os resultados demonstram que alguns filogrupos de *E. coli* estão

associados com o hospedeiro estudado e permitem um melhor entendimento da composição filogenética de *E. coli* nos animais domésticos.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; bezerro; bovino; bubalino; aves; APEC; grupo filogenético.

ABSTRACT

Escherichia coli pathotypes are important enteropathogens involved in the diarrheal syndrome. Pathogenic *E. coli* are classified into pathotypes according to the production of virulence factors and mechanisms which they cause the disease. Five pathotypes have been identified associated *E. coli* diarrhea in calves: enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC). In this study, *E. coli* strains isolated from feces of cattle and buffalo calves and poultry carcasses were studied. Phylogenetic analysis of the 336 strains of *E. coli* isolated from bovine calves showed that 21 (6.25%) belonged to phylogroup A, 228 (67.85%) to phylogroup B1, 2 (0.6%) to phylogroup B2, 5 (1.49%) to phylogroup C, 57 (16.96%) to phylogroup E and 3 (0.9%) the filogrupo F. Phylogroup D was identified and twenty samples (5.95%) were designated as phylogroup "unknown". Only ETEC was associated with the presence of diarrhea ($P = 0.002$) and there was no association between the phylogenetic group of *E. coli* and the presence of diarrhea ($P = 0.164$). The correspondence analysis showed that EHEC and STEC are classified primarily as phylogroup B1.EAEC (EAST-1) phylogroup A, ETEC and EPEC phylogroup E. In total, 217 *E. coli* strains were isolated from feces of buffalo calves. Pathotypes identified in diarrheic feces were ETEC (2/84), NTEC (16/84), STEC (20/84), EPEC (3/84), EHEC (3/84) and EAEC (33/84). In non-diarrheic feces the pathotypes identified were NTEC (21/50), STEC (17/50), EHEC (1/50) and EAEC (7/50). Feces from animals' aged 1 to 30 days were more frequently positive for *E. coli* virulence factors. Pathotype EAEC (EAST-1) ($P = 0.008$) and phylogroup C ($P = 0.03$) were associated with the presence of diarrhea. The analysis of *E. coli* phylogroup showed that 58.95% were phylogroup B1, followed by phylogroup s E (9.70%), B2 (5.9%), C (5.9%), D (5.22%), A (2.24%) and F (1.50%). *E. coli* strains isolated from poultry carcasses with normal appearance and carcasses condemned of colibacillosis in a slaughterhouse with Federal Inspection Service in the state of Tocantins were analyzed. One hundred and thirty seven samples of *E. coli* were obtained after isolation and biochemical identification. Eighty-four samples of *E. coli* were isolated from broiler carcasses condemned, of which 11 were isolated from the heart, 7 from the liver and 66 from the respiratory tract. Of the 53 strains isolated from normal poultry carcasses, 5 were isolated from heart, 4 from liver and 44 from the respiratory tract. The phylogroups A followed by B1 were the most common *E.coli* phylogroups isolated from healthy broiler carcasses, while phylogroups B1 followed by the A were more common in broiler carcasses condemned. The phylogroups B2, C, D, E and F were the least common phylogroups. The distribution of phylogenetic groups of 529 *E. coli* strains isolated from the three animal species were studied The frequency of phylogroups was: A = 15.31%, 60.49% = B1, B2 = 2.46%, C = 4.35%, D = 2.46%, 12.29% and E = F = 2.64%. The phylogroups A ($P < 0.001$) and F ($p = 0.002$) were associated with *E. coli* isolated from poultry, phylogroups B1 ($P < 0.001$) and E ($P < 0.001$) with *E. coli* isolated from cattle and phylogroups B2 ($P < 0.001$) and D ($P = 0.007$) with *E. coli* isolated from buffalo. The results demonstrate that some phylogroups of *E. coli* are associated with the host studied and allow a better understanding of the phylogenetic composition of *E. coli* isolated from domestic animals

Keywords: *Escherichia coli*; calf; cattle; buffalo; poultry; APEC; phylogenetic group.

INTRODUÇÃO GERAL

Desde a sua descoberta no início do século XIX, *Escherichia coli* tem sido vastamente estudada por constituir um grupo versátil de bactérias que fazem parte da microbiota indígena dos seres humanos e dos animais, mas que podem causar diferentes síndromes clínicas nos seus hospedeiros, com uma variedade de mecanismos e fatores de virulência. Diferentes amostras de *E. coli* causam diversas doenças intestinais e extraintestinais por meio de fatores de virulência que alteram diversos processos celulares. Esses fatores de virulência são adquiridos em sua maioria por elementos móveis do genoma que podem ser trocados entre amostras, permitindo a criação de diferentes amostras capazes de causarem doenças. O conhecimento das características genotípicas e, mais recentemente, da distribuição filogenética das amostras de *E. coli* são importantes para o entendimento dos mecanismos de patogenicidade.

Três síndromes clínicas principais podem resultar da infecção por *E. coli* patogênica: i. diarreia, ii. septicemia e iii. infecções do trato urinário. Os patótipos diarreio gênicos mais importantes em bovinos e bubalinos são *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC). *E. coli* patogênica aviária (APEC) causam doenças sistêmicas e celulite em aves, resultando em prejuízos econômicos para indústria avícola.

No Brasil, a criação de bovinos, bubalinos e aves cresce a cada dia e Minas Gerais se destaca como importante estado criador dessas espécies. Em função da diversidade genotípica de *E. coli* e de sua importância na etiologia da diarreia em bezerros bovinos e bubalinos e da colisepticemia nas aves, é fundamental caracterizar isolados de *E. coli* obtidos de animais com sintomatologia clínica e saudáveis para determinar características genotípicas que possam estar envolvidas no surgimento ou não da colibacilose. A literatura sobre *E. coli* diarreio gênicas tem como foco principal os patótipos de *E. coli* patogênicos para seres humanos, principalmente EHEC O157:H7. Além disso, existem poucos trabalhos epidemiológicos no Brasil e em outros países relacionando os patótipos e os grupos filogenéticos de *E. coli*, principalmente em amostras isoladas de bubalinos e do patótipo NTEC.

HIPÓTESES

Amostras de *E. coli* isoladas de bovinos e bubalinos com e sem diarreia e aves possuem fatores de virulência diferentes que podem estar envolvidos no desencadeamento da diarreia. Os patótipos de *E. coli* identificados pertencem a determinados grupos filogenéticos e a frequência dos diferentes grupos filogenéticos diferem entre as espécies animais.

OBJETIVOS

Os objetivos do estudo são:

- i) Caracterizar por meio de uma PCR os isolados de *E. coli* obtidos de fezes de bezerros bovinos e bubalinos com e sem diarreia, para se determinar fatores de virulência que possam estar envolvidos no surgimento da diarreia, os grupos filogenéticos mais frequentes e as faixas etárias mais suscetíveis de acordo com o patótipo identificado.
- ii) Caracterizar os grupos filogenéticos mais frequentes em amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frango condenadas por suspeita de colibacilose ou liberadas para o consumo ao abate.
- iii) Determinar os grupos filogenéticos de *E. coli* mais frequentes em cada espécie de animal estudada.

1. CAPÍTULO 1: PATOTIPOS DE *ESCHERICHIA COLI* CAUSADORES DE DIARREIA EM BEZERROS: UMA ATUALIZAÇÃO

1.1. RESUMO

A diarreia é uma das doenças mais frequentes de bezerros com até 30 dias de idade e é uma importante causa de perdas econômicas. Sua etiologia é complexa e envolve a interação de diversos fatores infecciosos, nutricionais, imunológicos, gerenciais e ambientais. Os principais sinais clínicos da síndrome diarreica são a diarreia, desidratação progressiva, acidose metabólica, desequilíbrio de eletrólitos e balanço energético negativo com ou sem hipoglicemia, que se não tratados, levam à morte do animal. Patotipos de *Escherichia coli* se destacam como importantes enteropatógenos envolvidos na síndrome diarreica. Amostras de *E. coli* patogênicas são classificadas em grupos ou patotipos, de acordo com a presença de fatores de virulência e mecanismos pelos quais causam doença. Já foram identificados cinco patotipos de *E. coli* associados à diarreia em bezerros: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC). Nessa revisão apresentamos as principais características e os atuais conhecimentos sobre os patotipos de *E. coli* causadores de diarreia em bezerros.

1.2. INTRODUÇÃO

A diarreia é uma das doenças mais prevalentes em bezerros, principalmente nas quatro primeiras semanas de vida. É causa de importantes perdas econômicas nessa faixa etária, pois causa perda de água e eletrólitos, o que resulta em desidratação, desequilíbrios eletrolíticos, acidose metabólica e morte (BUTLER; CLARKE., 1994). Vários fatores de risco influenciam a ocorrência da doença, como idade do animal, condição imunológica, condições climáticas e higiene (ACRES, 1985; RADOSTITS, 2007). Diversos enteropatógenos podem causar diarreia, com destaque para amostras de *Escherichia coli* patogênica, agente etiológico da colibacilose (BUTLER; CLARKE, 1994; BLANCHARD, 2012).

E. coli são bactérias Gram negativas, fermentativas, anaeróbias facultativas, cultivadas facilmente em meios de cultura de rotina. A via de transmissão de *E. coli* diarreiogênica é fecal-oral por meio de água e alimentos contaminados. Comumente isoladas de fezes, na maioria das vezes *E. coli* são comensais, não causando doença em seus hospedeiros. Entretanto, em animais debilitados, imunocomprometidos ou com a barreira gastrointestinal alterada, amostras de *E. coli* não patogênicas presentes no intestino podem causar infecção (NATARO; KAPER, 1998). Desta forma, para confirmação de diarreia por *E. coli* é necessária a identificação de amostras de *E. coli* diarreiogênicas (NATARO; KAPER, 1998; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Antes da identificação de fatores de virulência específicos de *E. coli* diarreiogênicas, a sorotipagem era o método mais utilizado para identificar amostras associadas à diarreia. A

determinação dos sorogrupos e sorotipos de *E. coli* a partir da identificação dos antígenos somáticos (O), capsulares (K) e flagelares (H) são importantes para a caracterização de isolados associados às infecções e para estudos epidemiológicos. Os antígenos fimbriais (F), estruturas proteicas que se projetam da superfície da bactéria e permitem sua fixação à mucosa intestinal, também são utilizadas na classificação de amostras de *E. coli*, principalmente as denominadas *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) (NATARO; KAPER, 1998). *E. coli* de determinados sorogrupos podem ser associadas a síndromes clínicas, pois estes sorogrupos correlacionam-se com certas linhagens virulentas e grupos específicos de *E. coli* diarreioxigênicas. Entretanto, a sorotipagem é trabalhosa e realizada por poucos laboratórios, além desses marcadores não serem suficientes para caracterizar uma cepa como diarreioxigênica (NATARO; KAPER, 1998).

O estudo da diversidade de *E. coli* antecede o surgimento da era molecular, com estirpes inicialmente distinguidas por sorotipagem. Porém, o sorotipo não se correlaciona com a diversidade genética dessa espécie, com amostras geneticamente distantes com o mesmo sorotipo e, inversamente, amostras estreitamente relacionadas de diferentes sorotipos. O conhecimento genético de *E. coli* iniciou-se com a aplicação do MLEE (*Multi-locus enzyme electrophoresis*) e progrediu com o surgimento do MLST (*Multi-locus sequence typing*) e acumulação de dados de sequências nucleotídicas. A acumulação dessas informações definiu sete grandes grupos filogenéticos, designados A, B1, B2, C, D, E e F. (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; CLERMONT et al., 2013).

A tipagem filogenética permite que estirpes sejam classificadas em um dos sete filogrupos. Desde a sua introdução, em 2000 (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000), a tipagem filogenética utilizando uma PCR tornou-se amplamente utilizada devido à sua simplicidade e rapidez. O método foi aprimorado em 2013 (CLERMONT et al., 2013) e por meio de uma PCR quadruplex é possível identificar os sete filogrupos. O MLST é a melhor técnica de tipificação de *E. coli*, mas o tipo de sequência (ST) fornecida na análise não permite a classificação direta em filogrupos sendo necessário determinar a correspondência entre ST e grupos filogenéticos, com esta última realizada por meio do "método de Clermont" (CLERMONT et al., 2013; CLERMONT; GORDON; DENAMUR, 2015). Além disso, MLST é uma técnica mais cara e trabalhosa. A tipagem filogenética pela PCR tem 80-95% de correspondência com a análise por MLST, demonstrando que o teste pode ser utilizado para estudos de diversidade genética de amostras de *E. coli* (GORDON et al., 2008; CLERMONT et al., 2013).

A identificação dos filogrupos é importante para compreender como *E. coli* causa doença. Existem três *MLST databases* para *E. coli* baseadas em três combinações de genes diferentes com apenas um gene em comum, *icd*. A razão para a escolha dos genes utilizados nas diferentes técnicas de MLST não é claro, mas os genes usados são todos constitutivos (*housekeeping*) (CLERMONT; GORDON; DENAMUR, 2015),

Os estudos de tipagem filogenética mostraram que as estirpes pertencentes às diferentes filogrupos podem estar associadas com a fonte de isolamento (CLERMONT et al., 2013). Os filogrupos A e B2 são os mais comuns em *E. coli* isoladas de seres humanos, sendo o B1 e D os menos prevalentes. Os filogrupos B1 seguido de A, B2 e, em menor grau, de D são os mais comuns de *E. coli* isoladas de animais (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012). Os estudos sugerem que as infecções extraintestinais são causadas principalmente pelo filogrupo B2, enquanto as infecções intestinais são causadas principalmente pelos filogrupos A, B1 e E (CLERMONT et al., 2011).

O filogrupo F é composto de linhagens que formam um grupo irmão do filogrupo B2. O filogrupo C parece estar relacionados com o filogrupo B1. Os filogrupos F e B2 são os mais basais, surgindo primeiro, enquanto que os filogrupos A e B1 e C divergiram mais recentemente. Além disso, uma estrutura genética clara foi identificada dentro do grupo filogenético B2, com pelo menos nove subgrupos (I-IX). O grupo D é mais diverso que o grupo C, que é mais clonal. O filogrupo E é mais clonal enquanto os filogrupos A e B1 são mais diversos (CLERMONT et al., 2011).

Apesar das suas vantagens sobre o a PCR-triplex, a PCR quadruplex não atribui um grupo pequeno de amostras a um grupo filogenético. Essas falhas ocorrem porque uma pequena fração de amostras de *E. coli* não podem ser classificadas em filogrupos provavelmente devido a recombinações entre amostras de filogrupos diferentes ou devido à alta variabilidade do conteúdo genético de *E. coli*, que ocorre através de ganhos e perdas de genes (CLERMONT et al., 2013). Características como dieta, morfologia intestinal, massa corporal e localização geográfica interferem na frequência dos filogrupos de *E. coli*. Em animais, a domesticação parece ser também um fator que interfere na frequência dos diferentes grupos filogenéticos (GORDON et al., 2008).

Como na maioria dos patógenos de mucosa, *E. coli* segue uma estratégia de infecção: i) colonização da mucosa, ii) evasão das defesas do hospedeiro, iii) multiplicação e iv) dano ao hospedeiro. *E. coli* causadoras de infecções entéricas em geral apresentam diferentes sorotipos e fatores de virulência. A colonização das células intestinais ocorre por meio de adesinas, que podem ser fimbriais ou não. A produção de diversas toxinas, que interagem com os enterócitos de maneiras diferentes, também é uma característica comum de amostras diarreio gênicas de *E. coli*. Algumas amostras de *E. coli* interagem com o citoesqueleto das células intestinais, modificando a estrutura das microvilosidades das células das vilosidades intestinais. Esses fatores de virulência são codificados por genes presentes em ilhas de patogenicidade ou em plasmídeos de virulência, podendo também ser transferidos entre amostras de *E. coli* por bacteriófagos. Atualmente, a identificação de genes de virulência por PCR têm demonstrado ser rápida, prática e sensível na identificação de *E. coli* diarreio gênicas (NATARO; KAPER, 1998; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

As amostras de *E. coli* consideradas patogênicas podem ser classificadas em grupos ou patotipos de acordo com a presença de fatores de virulência e dos mecanismos pelos quais causam doença (NATARO; KAPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). As características dos principais patotipos de *E. coli* causadores de diarreia em bezerros são mostrados na tabela 1.1.

Tabela 1.1 Principais características dos patotipos de *E. coli* causadores de diarreia em bezerros

Patotipo	Fatores de virulência		Sorogrupos
	Adesina	Toxina	
ETEC ^a	F5, F41, F17 e CS31A	STa	O8, O9, O20, O101
EPEC ^b	Intimina, Lpf, Iha, Efa1, ToxB	-	O26, O111, O119, O114
STEC ^c	Saa, ToxB, Lpf, Iha	Stx1, Stx2	O8, O20
EHEC ^d	Intimina, Efa 1, ToxB, Lpf, F9, Iha	Stx1, Stx2, Ehx	O5, O26, O111, O118, O145
NTEC ^e	P, S, F17, Afa	CNF1, CNF2	O1, O3, O15, O88, O123

^a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), ^b *E. coli* enteropatogênica (EPEC), ^c *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), ^d *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e ^e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC)

Já foram identificados cinco patotipos de *E. coli* associados à diarreia em bezerros: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC). Na Figura 1.1 encontra-se um esquema da interação entre os principais patotipos de *E. coli* associados a diarreia de bezerros e as células epiteliais da mucosa intestinal. Outros patotipos diarreio gênicos para seres humanos, como *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) ainda não foram confirmados como causadores de diarreia em bezerros (NATARO; KAPER, 1998; DEBROY; MADDOX, 2001; GYLES; FAIRBROTHER,

2010). Nessa revisão apresentamos as principais características e os atuais conhecimentos sobre os mais importantes patótipos de *E. coli* causadores de diarreia em bezerros.

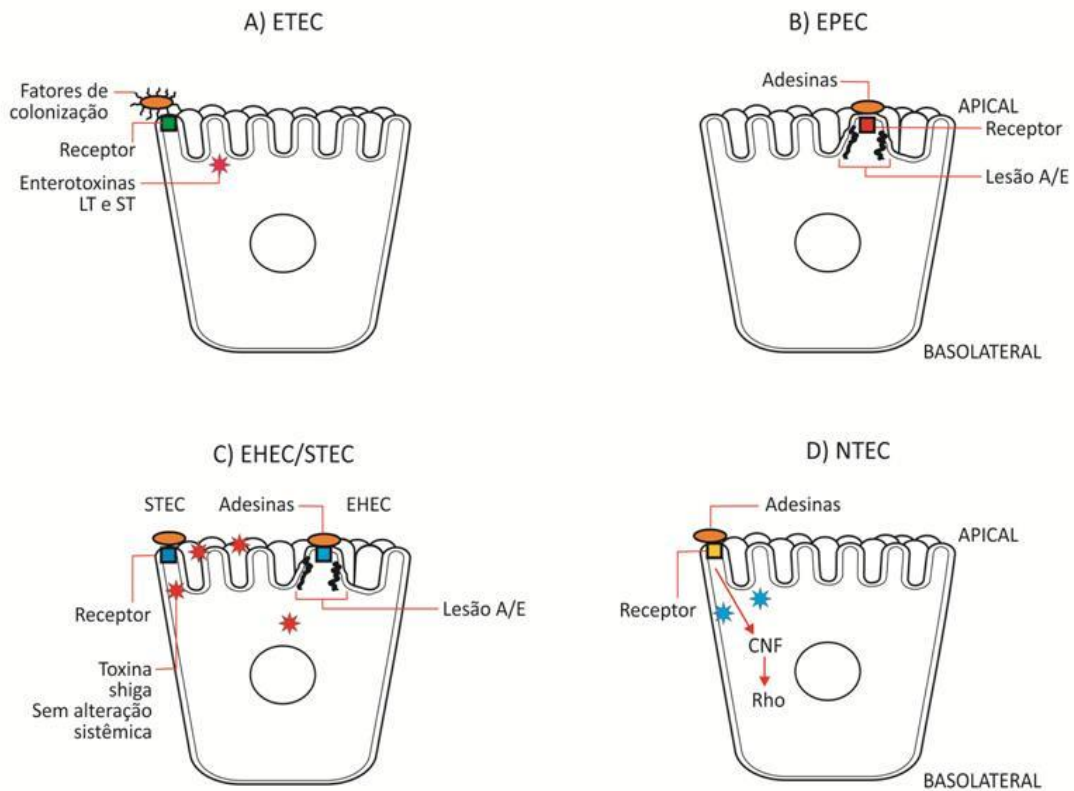


Figura 1.1. Representação esquemática da interação entre as células epiteliais intestinais com os principais patótipos de *E. coli* associados a diarreia em bezerros. A. ETEC – *E. coli* enterotoxigênica; ETEC aderem aos enterócitos e produzem toxinas termolábeis (LT) ou termoestáveis (ST). B. EPEC – *E. coli* enteropatogênica; EPEC aderem aos enterócitos e causam lesões attaching and effacing (A/E), alterando a arquitetura das microvilosidades. C. EHEC – *E. coli* enterohemorrágica; STEC – *E. coli* produtora de toxina Shiga; EHEC e STEC aderem aos enterócitos e produzem toxinas Shiga, sem absorção e alteração sistêmicas; A indução de lesões A/E por EHEC é a característica que as diferencia de STEC. D. NTEC – *E. coli* necrotoxigênica; NTEC se aderem aos enterócitos e produzem toxinas CNF1 ou CNF2 que induzem a desaminação de membros da família das Rho GTPases, resultando na ativação permanente dessas proteínas.

1.3. PATOTIPOS DE *E. COLI* CAUSADORES DE DIARREIA EM BEZERROS

1.3.1. *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC)

ETEC são caracterizadas por colonizarem a superfície da mucosa do intestino delgado, principalmente o íleo, e por produzirem enterotoxinas termoestáveis (ST) e termolábeis (LT) que alteram as funções dos enterócitos, aumentando a secreção e reduzindo a absorção de líquidos, sem induzirem alterações morfológicas significativas no intestino (NATARO; KAPER, 1998; NAGY; FEKETE, 2005).

As toxinas termoestáveis são denominadas STaP, STaH e STb. STaP e STaH (ou STI) possuem 18 e 19 aminoácidos, respectivamente, com um peso molecular de menos de 2 kDa, enquanto STb (ou STII) possui 48 aminoácidos e tem um peso molecular de 5kDa. STaP é produzida por ETEC de animais (bovinos, ovinos, suínos e caninos) e seres humanos, e STaH por ETEC de seres humanos. STb é encontrada em ETEC isoladas de suínos (MAINIL, 2013).

Dois tipos de toxinas LT são produzidas, LTI e LTII. LTI pode ser subdividida em LTIh, de ETEC de seres humanos, e LTIp, de ETEC de suínos e seres humanos. LT-IIa e LT-IIb são produzidas por ETEC isoladas de seres humanos e, com menor frequência, de bovinos e bubalinos. LT ativa adenilato ciclase, resultando no aumento dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e, conseqüentemente, aumento da secreção de íons cloreto e carbonato, de água e na inibição da absorção de sódio (MAINIL, 2013).

A maioria das ETEC que causam diarreia em bezerros é caracterizada por possuir principalmente as adesinas fimbriais F5 (K99) e F41 e por produzir STa. Outras adesinas menos frequentes em ETEC isoladas de bezerros são F17 e CS31A (não fimbrial) (Tabela 1) (BUTLER; CLARKE, 1994; DEBROY; MADDOX, 2001). Os sorogrupos mais comuns entre as ETEC associadas à diarreia em bezerros são O8, O9, O20 e O101 (BUTLER; CLARKE, 1994).

A adesão de ETEC no intestino delgado ocorre por fatores de colonização fimbriais ou não fimbriais (CROXEN; FINLAY, 2010). A ligação da ETEC ao epitélio intestinal impede que estas bactérias sejam totalmente eliminadas pelo peristaltismo e permite a colonização do intestino, principalmente a parte distal do intestino delgado. Em seguida a aderência às células intestinais, ETEC produzem enterotoxina STa (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). O receptor de STa é a guanilato ciclase C (GC-C), presente nas microvilosidades intestinais. A ligação da toxina no receptor resulta no aumento intracelular de monofosfato guanilato cíclico (cGMP), que ativa a proteína quinase II cGMP-dependente (cGKII). Essa quinase fosforila e ativa o canal de cloreto (CFTR), o que resulta na secreção de íons cloreto e bicarbonato, na inibição da absorção de íons sódio e no efluxo de água para o lúmen intestinal (FOSTER; SMITH, 2009; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

As infecções por ETEC são espécie-específicas principalmente em função da presença de receptores específicos para adesinas em células intestinais de uma ou de um número limitado de espécies, não sendo, portanto, consideradas como zoonóticas, em contraste com as infecções por EHEC e STEC (NAGY; FEKETE, 2005).

ETEC é o patotipo mais comumente associado à diarreia em bezerros na primeira semana de vida, principalmente aos 3-4 dias (FOSTER; SMITH, 2009; BLANCHARD, 2012). Diversos pesquisadores encontraram esse patotipo em bezerros com mais de uma semana de idade (GÜLER; GÜNDÜZ; OK, 2008; BARTELS et al., 2010; ANDRADE et al., 2012; COURA et al., 2015). A razão da restrição da infecção por ETEC à primeira semana de idade dos bezerros não é totalmente conhecida. 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. Entretanto, pode haver aumento do período de susceptibilidade se ocorrer atrofia das vilosidades intestinais, como acontece nas infecções por vírus e *Cryptosporidium* spp., resultando em migração de células imaturas das criptas (BLANCHARD, 2012).

Sabe-se que em ratos e seres humanos a densidade do receptor GC-C diminui após o nascimento, mas permanece presente em suínos até sete semanas de vida. Em bezerros nenhum estudo detalhado sobre a expressão de GC-C em diferentes idades foi realizado, porém inoculação oral com STa induziu diarreia em bezerros com até 15 dias de idade (FOSTER; SMITH, 2009).

Na colibacilose por ETEC, os animais jovens apresentam diarreia profusa pastosa a líquida, com odor fétido e coloração amarelada a brancacenta. Nos casos agudos, a perda de água e eletrólitos é rápida, e os animais apresentam desidratação grave e acidose metabólica, podendo levar a morte. Observa-se a distensão dos intestinos delgado e grosso, com presença de líquido e gás, mucosa fina e brilhante e nenhuma alteração histopatológica.

A síndrome diarreica é multifatorial e pode envolver mais de um enteropatógeno, dificultando o diagnóstico clínico. Mas a possível participação de ETEC na diarreia em bezerros pode ser sugerida pelos seguintes fatores: i) idade do animal inferior a uma semana, ii) característica das fezes, iii) desenvolvimento agudo da infecção, com grave diarreia e desidratação, animal em posição de decúbito e perda de peso. Para o diagnóstico de infecção por ETEC é necessário o isolamento bacteriano de fezes ou conteúdo intestinal e a identificação dos fatores de virulência característicos de ETEC, fímbrias e toxinas, utilizando testes laboratoriais como testes de aglutinação, ELISA ou PCR (ACRES, 1985; BUTLER; CLARKE, 1994), todos disponíveis no país.

1.3.2. *E. COLI* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)

A principal característica deste patotipo é causar uma lesão denominada de *attaching and effacing* - A/E. A lesão A/E é caracterizada por uma adesão íntima da bactéria ao epitélio intestinal, com destruição das microvilosidades intestinais, alterações no citoesqueleto, com formação de estruturas semelhantes a pedestais e acúmulo de actina polimerizada logo abaixo da ligação da bactéria à célula. Os principais genes responsáveis pela lesão A/E estão inseridos numa ilha de patogenicidade denominada LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), presente nos patotipos EPEC e EHEC (NATARO; KAPER, 1998; MAINIL; DAUBE, 2005). *E. coli* capazes de causar esse tipo de lesão são também denominadas AEEC (*attaching and effacing Escherichia coli*).

EPEC coloniza principalmente o intestino delgado e sua aderência nas microvilosidades intestinais desencadeia a expressão dos genes localizados na LEE. Após sua ligação com a célula hospedeira, há o envio de sinais para estas por meio de um sistema de secreção tipo III (SST3), cujos genes estão localizados na LEE. O SST3, inserido na membrana citoplasmática do enterócito, transloca diretamente proteínas efetoras da bactéria para dentro do citoplasma da célula do hospedeiro. Estas proteínas efetoras agem em proteínas celulares eucarióticas resultando na polimerização da actina, rearranjos do citoesqueleto e destruição das microvilosidades (DEBROY; MADDOX, 2001; MAINIL; DAUBE, 2005; MAINIL, 2013).

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. O receptor da célula alvo para intimina recebe o nome de Tir (*translocated intimin receptor*), uma proteína codificada pela LEE, translocada para a célula alvo pelo SST3 e que se insere na membrana citoplasmática do enterócito (MAINIL; DAUBE, 2005; MAINIL, 2013). Mais de 21 variantes de intimina já foram identificadas, designadas por letras gregas, e que diferem na sua sequência de aminoácidos na parte carboxiterminal. Uma vez que a interação entre intimina e Tir está localizada no aminoácido carboxiterminal 280 da adesina intimina, os diferentes tipos de intimina interagem especificamente com o seu receptor cognato Tir. Receptores alternativos para intimina na célula hospedeira são as beta1-integrinas e as nucleolinas (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; MAINIL, 2013). A proteína Tir fosforilada recruta Nck (*non-catalytic region of tyrosine kinase*) que ativa a proteína da síndrome neural Wiskott-Aldrich (N-WASP) e o complexo de proteína 2/3 relacionado à actina (ARP2/3) para mediar o rearranjo de actina e formação das estruturas semelhantes a pedestal (CROXEN; FINLAY, 2010).

Além da ilha de patogenicidade LEE, EPEC podem 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 não possuem BFP e EAF, são denominadas EPEC atípicas. A adesina BFP contribui para a ligação da bactéria às células eucarióticas e resulta em aderência localizada em cultura de células (NATARO; KAPER, 1998; BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). No caso de EPEC isoladas de bezerros, BFP não foi identificada e outras adesinas podem estar envolvidas na aderência e, provavelmente, na colonização das células intestinais, como Iha (*IrgA Homologue Adhesin*), Efa1 (*E. coli factor for adherence 1*), ToxB (*toxin B*) e Lpf (*long polar fimbriae*) (Tabela 1) (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010).

Não há uma faixa etária com maior susceptibilidade, como ocorre com ETEC, sendo detectada a infecção por EPEC em bezerros com 1 a 12 semanas de idade (CHINA; PIRSON; MAINIL, 1998; HOLLAND et al., 1999; FOSTER; SMITH, 2009). Os principais sorotipos de EPEC associados à diarreia em bezerros são O26, O111, O119, O114. EPEC causa diarreia pela ativação de sistemas secretórios, como a inibição da absorção de sódio e cloreto e ativação dos canais de cloreto, aumento da permeabilidade paracelular, afrouxamento das junções de oclusão (*tight junctions*), inflamação e produção de citocinas, e perda da área absorptiva em decorrência da destruição das microvilosidades (MAINIL; DAUBE, 2005; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

O diagnóstico clínico é difícil, sendo que não existem sinais clínicos característicos. A consistência e a cor das fezes variam. As fezes podem estar aquosas ou normais, amareladas ou sanguinolentas. EPEC resulta em uma diarreia mais crônica, diferente da ocorrência aguda da colibacilose por ETEC, e ocorre principalmente em animais acima de uma semana de idade. O diagnóstico histopatológico de partes do íleo (principalmente junção ileocecal) e cólon pode ser usado para visualizar lesões do tipo A/E. 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*, e confirmação da ausência de genes codificadores de toxinas, necessário para diferenciar amostras de EPEC de STEC/EHEC (NATARO; KAPER, 1998; DEBROY; MADDOX, 2001; BLANCHARD, 2012).

1.3.3. E. COLI ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC) E E. COLI PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC)

E. coli enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), também conhecida como *E. coli* verotoxigênica (VTEC), em função do efeito citotóxico em células Vero, se referem a amostras de *E. coli* que produzem pelo menos uma 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. EHEC possui a mesma LEE de EPEC, porém o mecanismo de formação da estrutura semelhante ao pedestal é ligeiramente distinto das EPEC: não ocorre fosforilação de Tir pela célula hospedeira, a formação de pedestal

é independente de Nck, o rearranjo de actina é mediado por TccP (*Tir cytoskeleton-coupling protein*), que se liga ao Tir por meio de proteínas da célula alvo IRTKS (*insulin receptor tyrosine kinase substrate*), que interage com N-WASP para ativar o complexo ARP2/3 (CROXEN; FINLAY, 2010).

Durante muito tempo o termo EHEC foi utilizado para se referir a isolados de *E. coli* que causam doenças em seres humanos, como colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica, mas hoje 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 ou VTEC são usados para isolados de bactérias que produzem somente Stx (MAINIL; DAUBE, 2005). Alta porcentagem de bezerros infectados com estes patótipos não apresenta sinais clínicos, entretanto estes animais constituem importante reservatório de STEC/EHEC tanto para bovinos como para o ser humano (GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Em 2011, houve uma grande epidemia causada por um sorotipo raro de *E. coli* patótipo STEC e sorotipo O104:H4, envolvendo mais de 4.000 pessoas em 16 países europeus. Estudos epidemiológicos indicaram o consumo de brotos, principalmente os de feno-grego, como a origem do surto (CDC 2013). A análise genética do isolado demonstrou que ele pertence a dois grupos distintos de *E. coli*, EAEC e STEC, e foi classificado como STEAEC, por possuir genes de ambos os patótipos e de múltipla resistência a antibióticos. O cromossomo possui os fatores de virulência Pic, AAF, AggR, Pet e ShET1 de EAEC, e Stx2 e Iha de STEC (CLEMENTS et al., 2012).

O sorotipo de EHEC mais conhecido e de maior importância para seres humanos é o O157:H7, responsável por surtos de diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica. *E. coli* O157:H7 é a principal causa de colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica nos Estados Unidos, Canadá, Grã-Bretanha e Europa (BUCHANAN; DOYLE, 1997). No Brasil, a incidência de doenças gastrointestinais e síndrome hemolítica urêmica devido a EHEC O157:H7 é baixa e a frequência de seu isolamento de fezes bovinas é ausente, ou muito baixa, menos de 1% dos isolados (CERQUEIRA et al., 1999; IRINO et al., 2005; AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008). O isolamento de EHEC a partir de carcaças bovinas resfriadas ainda não foi decrito (CASELANI, 2010).

Os ruminantes, especialmente os bovinos, são portadores assintomáticos e considerados principais reservatórios de EHEC (GYLES, 2007). Surtos de infecção em seres humanos por EHEC estão associados ao consumo de vários tipos de alimentos como hambúrgueres mal cozidos, salsichas, leite não pasteurizado, alface, e suco de maçã. A dose infectante é baixa, menos de 100 células bacterianas, facilitando a infecção. Stx produzida pela bactéria presente no cólon cai na corrente sanguínea e vai para o rim, danificando células endoteliais e resultando em inflamação renal. O dano renal pode resultar em síndrome urêmica hemolítica, caracterizada por uma anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal aguda. Stx também danifica o

cólon, resultando em diarreia sanguinolenta e colite hemorrágica (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

EHEC não possui um sistema de secreção para Stx, a liberação da toxina ocorre por meio de lise do fago que codifica a toxina em resposta a danos no DNA bacteriano, por isso antimicrobiano terapia não deve ser usada em infecções por EHEC, pois aumenta a liberação da toxina agravando a síndrome (CROXEN; FINLAY, 2010). São descritos três subtipos de Stx1 (Stx1a, Stx1c, Stx1d) e sete subtipos de Stx2 (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g), sendo que as amostras produtoras de Stx2a, Stx2c e ou Stx2d são mais frequentemente associadas com a síndrome hemolítica urêmica em seres humanos. As amostras de *E. coli* produtoras de Stx2e são de grande importância em suinocultura, pois causam a doença do edema em suínos (MAINIL, 2013). Os genes que codificam Stx estão presentes e são transferidos por bacteriófagos para as amostras de *E. coli*.

As Stx possuem uma estrutura do tipo A1B5, onde as cinco subunidades B são responsáveis pela ligação da toxina à célula alvo e a subunidade A é o componente ativo da toxina. O receptor para Stx é o Gb3 (*globotriaosylceramide*), presente nas células de Paneth da mucosa intestinal e nas células epiteliais dos rins de seres humanos, ou Gb4 (*globotetraosylceramide*) para Stxe, presente no endotélio vascular e enterócitos de suínos. A toxina Stx pode atravessar o epitélio intestinal por meio de endocitose seguido por exocitose na parte basal do enterócito, mas o mecanismo não está totalmente elucidado. Em seres humanos e leitões, a Stx cai na corrente sanguínea e se liga aos receptores endoteliais. As Stx agem em células endoteliais dos vasos sanguíneos da mucosa gastrointestinal, dos rins, do cérebro e outros tecidos, causando extravasamento de líquido, hemorragias, a nefrotoxicidade observada em seres humanos e a neurotoxicidade observada em leitões com doença do edema (MAINIL; DAUBE, 2005; CROXEN; FINLAY, 2010; MAINIL, 2013).

Ruminantes não possuem esses receptores para Stx no endotélio vascular, mas os mesmos estão presentes nos enterócitos das criptas, linfócitos intraepiteliais e macrófagos da mucosa intestinal. EHEC/STEC podem colonizar o intestino dos ruminantes, embora não causem lesões vasculares e, por isso, sinais sistêmicos não são observados. Após a entrada da toxina na célula, a subunidade A remove uma adenina do rRNA 28S do ribossomo eucariótico, alterando sua função e resultando em inibição da síntese proteica, o que é letal para a célula (MAINIL; DAUBE, 2005; CROXEN; FINLAY, 2010; MAINIL, 2013).

A infecção oral com EHEC O118 (*eae/stx1*) em bezerros resulta em diarreia e em lesões A/E no final do intestino delgado e intestino grosso 24 h pós-infecção (STORDEUR et al., 2000). Girard et al. (2007) utilizaram explantes de intestino bovino cultivados *in vitro* (bIVOC) para estudar a infecção por *E. coli* dos sorogrupos O157 (*Stx1*, *Stx2* e *eae*), O26 (*Stx1* e *eae*) e O111 (*Stx1*) e demonstraram que todos os três sorogrupos aderiram intimamente ao epitélio do

íleo terminal, do cólon e do reto e produziram lesões A/E típicas, menos no cólon terminal, onde as lesões foram menos evidentes.

Apesar de alguns autores considerarem a diarreia como consequência da formação da lesão A/E e não da produção de qualquer Stx, existe associação experimental e epidemiológica de STEC com diarreia em bezerros (MAINIL; DAUBE, 2005; MAINIL, 2013). Outros fatores de virulência já foram detectados em STEC/EHEC isoladas de bezerros, como as adesinas F9, Iha (*IrgA Homologue Adhesin*), Saa (STEC *autoagglutinating adhesin*), ToxB (*Toxin B*), Lpf (*Long polar fimbriae*) e Efa1 (*E. coli factor for adherence 1*) (Tabela 1) (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010). A enterohemolisina (Ehx) já foi detectada em STEC/EHEC e pertence à família de toxinas RTX e sua ação resulta na formação de poros nas células alvo, mas sua contribuição na etiologia da diarreia por esses patótipos não é totalmente conhecida (MAINIL; DAUBE, 2005; MAINIL, 2013).

Os principais sorótipos de EHEC associados à diarreia em bezerros são O5, O26, O111, O118 e O145, e de STEC O8 e O20 (MAINIL; DAUBE, 2005). EHEC e STEC estão associadas à diarreia em bezerros com duas a oito semanas de idade (BUTLER; CLARKE, 1994). Apesar de não haver sinais clínicos muito característicos desses patótipos, é relatada, ao contrário do que acontece com infecções por ETEC, uma diarreia menos aquosa, com aspecto mucoide, às vezes sanguinolenta e com tendência à cronicidade, com os animais menos desidratados e raramente causando sua morte (BUTLER; CLARKE, 1994; DEBROY; MADDOX, 2001).

Animais afetados por EHEC apresentam lesões A/E no íleo terminal, cólon e reto, com edema e infiltrado neutrofílico na lâmina própria (DEBROY; MADDOX, 2001; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). A identificação de EHEC/STEC pode ser feita utilizando PCR para detecção dos principais genes de virulência, testes de citotoxicidade em células e ELISA para pesquisa das toxinas Shiga (DEBROY; MADDOX, 2001; BLANCHARD, 2012).

1.3.4. E. COLI NECROTOXIGÊNICA (NTEC)

NTEC são caracterizadas pela produção de toxinas CNF (fator necrotizante citotóxico) (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1998). A existência de dois tipos de CNF, tipo 1 e tipo 2 (CNF1 e CNF2), foi demonstrada em amostras de *E. coli* isoladas de bezerros, leitões e crianças com enterite (DE RYCKE et al., 1990). Ambos os tipos de citotoxinas são letais para camundongos quando inoculadas via intraperitoneal, compartilham a capacidade de induzir células gigantes multinucleadas em linhagem de células HeLa e necrose em pele de coelho, e são parcialmente relacionadas antigenicamente. Porém somente CNF2 induz necrose em pata de camundongo e produz acúmulo de fluido no teste da alça ligada de coelho (DE RYCKE et al., 1990). Uma nova toxina necrotizante, denominada CNF3, foi identificada em isolados de *E. coli* obtidas de ovinos e caprinos (ORDEN et al. 2007). Os autores para identificarem a CNF3,

clonaram e sequenciaram o gene *cnf3* presente em uma cepa de NTEC denominada C48a (O153:H11) isolada de uma ovelha saudável e, por meio da PCR, identificaram o gene em amostras isoladas das fezes de caprinos e ovinos (ORDEN et al. 2007).

O gene codificador para CNF1 está localizado em uma ilha de patogenicidade cromossomal, entre os genes de alfa hemolisina (*hly*) e os genes codificadores de adesinas P (*pap/prs*). O gene codificador para CNF2 está no plasmídeo *Vir*, que também contém genes para outros fatores de virulência como a toxina distensora citoletal tipo 3 (CDTIII), adesina Afa-VIII, fímbria F17 e hemolisina (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1998; JOHNSON et al., 2010). É comum encontrar esses e outros fatores de virulência em conjunto com CNF: CNF1 pode ser encontrada juntamente com hemolisina, fímbrias P, fímbrias S, F17 e adesinas afimbriais Afa e CNF2 com F17, Afa e CDTIII (Tabela 1) (MAINIL, 2013). Outro fator de virulência presente em NTEC, e também em isolados de ETEC, de STEC e de *E. coli* que causam infecções extraintestinais, é a alfa hemolisina, porém seu papel na patogênese da diarreia ainda é incerto (MAINIL, 2013).

CNF e outros fatores de virulência foram pesquisados em amostras de *E. coli* isoladas de fezes de bezerros e filhotes de cães com e sem diarreia e de urina coletada de cães adultos com cistite (SALVARANI et al., 2012). CNF foi identificada em *E. coli* de ambas as espécies, em casos de diarreia e cistite, conjuntamente com os fatores de virulência hemolisina, fímbria P, fímbria S, fímbria tipo 1 e toxina distensora citoletal. Nos isolados obtidos de bovinos, todas as amostras positivas para o gene *cnf2* foram positivas para *cdt-iii*.

As toxinas CNF induzem a desaminação de membros da família das Rho GTPases: Glutamina 63 (Gln63) de Rho e, Gln61 de Rac e Cdc42. Isto impede a hidrólise de GTP e resulta na ativação permanente da proteína. A ativação de Rho resulta na formação de fibras de estresse, que são feixes de filamentos espessos paralelos contráteis de actina. A ativação de Rac conduz à formação de lamelipódio, estruturas bidimensionais semelhantes a camadas ou lençóis contendo uma rede de filamentos de actina interligados ortogonalmente. CNF também induz formação de filopódio em decorrência da ativação de Cdc42, estruturas unidimensionais que contêm um núcleo de longos filamentos de actina em feixe. Essas modificações promovem o achatamento do corpo da célula decorrente da ativação das Rho GTPases, as células se tornam multinucleadas (ALBERTS et al., 2010; KNUST; SCHMIDT, 2010).

Em células T84 (células de carcinoma colorretal humano), CNF1 ativa Rho, Rac e Cdc42, aumenta a permeabilidade paracelular e induz reestruturação e reorganização das proteínas das junções de oclusão (occludina, ZO-1, JAM-1) assim como de F-actina (HOPKINS, 2003). Em células Caco-2 (células de carcinoma de cólon humano) foram verificados também a ativação de Rho GTPases e a diminuição da resistência transepitelial (BLUMENTHAL et al., 2007). Desta forma a ativação de Rho GTPases parece estar envolvida no surgimento da diarreia.

NTEC1 já foi isolada de diarreia em ruminantes, suínos, cães, coelhos e equinos, de septicemia em suínos, de infecções no trato urinário e outras infecções extraintestinais em cães, gatos e seres humanos (VAN BOST et al., 2001). CNF1 também é um importante fator de virulência de UPEC (*Escherichia coli* uropatogênica). Ele está associado a vários outros fatores de virulência como aerobactina, fímbrias P e hemolisina. Quase todos os isolados de UPEC positivos para CNF1 contêm o gene para alfa hemolisina. CNF1 também já foi encontrada em *E. coli* isoladas de meningite em crianças (BOQUET, 2001; KNUST; SCHMIDT, 2010).

NTEC2 já foi isolada de bovinos, caprinos, equinos e gatos (POHL et al., 1993). NTEC2 tem sido isolada principalmente de ruminantes jovens com diarreia, mas também de septicemia, pneumonia, metrite e mastite em bovinos (VAN BOST et al., 2001). NTEC2 é o patotipo mais frequentemente isolado de bovinos com diarreia e septicemia (BURNS; BALL; FINLAY, 1996). CNF3 foi identificada em *E. coli* isoladas de cordeiros com e sem diarreia e cabritos saudáveis (ORDEN et al. 2007). Os sorogrupos de NTEC2 mais frequentes em bovinos são O1, O3, O15, O88 e O123 (BLANCO et al., 1998; ORDEN et al., 1999).

Em um estudo realizado na Espanha, NTEC foi pesquisada em *E. coli* isoladas de 246 bezerros com diarreia. NTEC foi detectada por PCR nas fezes de 39 dos 246 animais diarreicos, sendo que 34 animais estavam infectados por NTEC positiva para *cnf2* e 5 para *cnf1*. Além disso, foi encontrada uma associação entre a idade e a infecção por NTEC2, na qual o risco de infecção por NTEC em bezerros diarreicos aumenta com a idade, principalmente em animais com 31 a 90 dias de idade (ORDEN et al., 1999).

Estudos envolvendo NTEC produtora de CNF2 e utilizando bezerros recém-nascidos que não receberam colostro e desafiados oralmente demonstram que este patotipo é capaz de colonizar o intestino e causar diarreia, além de invadir a corrente sanguínea e ir para órgãos internos, principalmente os pulmões. À necropsia foram observadas 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 (VAN BOST; ROELS; MAINIL, 2001; VAN BOST et al., 2003).

A confirmação da diarreia causada por NTEC pode ser realizada pela identificação dos genes codificadores das CNF em isolados bacterianos obtidos de fezes e lesões intestinais ou outros órgãos, no caso de septicemia, utilizando a técnica de PCR, ou também por meio de testes de citotoxicidade em cultura de células (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1998; ORDEN et al., 1999).

1.4. ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS BRASIL

Os estudos epidemiológicos realizados no Brasil indicam a presença dos patotipos associados à diarreia em bezerros, tanto em rebanhos de bovino de leite como de corte. Porém

os resultados entre os estudos divergem, devido a diversos fatores como a região geográfica estudada, época do ano, número de animais e método de diagnóstico empregado. A frequência de ETEC varia desde zero até 30% (LAGE et al. 1993; MENDONÇA et al. 1996; LANGONI et al. 2004; RIGOBELLO et al. 2006; OLIVEIRA FILHO et al. 2007; MOURA et al. 2012, ANDRADE et al. 2012; COURA et al., 2015). EPEC varia desde 1,42% até 42,5% (RIGOBELLO et al. 2006; AIDAR-UGRINOVICH et al. 2007; MOURA et al. 2012; ANDRADE et al. 2012; COURA et al., 2015) e STEC e EHEC varia entre 2,7% até mais de 50% (RIGOBELLO et al. 2006; AIDAR-UGRINOVICH et al. 2007; ANDRADE et al. 2012; COURA et al., 2015).

Um estudo foi realizado no estado de São Paulo com o objetivo de determinar a prevalência de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) em isolados de animais com e sem diarreia. *E. coli* positiva para o gene *Stx* (toxina Shiga) foi encontrada em quarenta e quatro animais sendo 28 (20%) com diarreia e 16 (7,8%) saudáveis. Vinte e quatro isolados produziram a toxina Shiga, dos quais 12 foram positivos para o *Stx1*, oito para *Stx1* e *Stx2* e quatro para *Stx2*. Dez isolados foram positivos para o gene *eae* (LEOMIL et al., 2003).

Na região Centro-Oeste do Brasil, amostras de *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia foram examinadas quanto à presença de fatores de virulência associados à colibacilose bovina. A toxina *Stx1* foi detectada em 20 amostras, a *Stx2* em 13 e a *STa* em oito. A adesina fimbrial F5 foi identificada em 15 isolados, dos quais quatro eram ETEC (F5/STa). A fímbria F41 não foi detectada e o gene *eae* foi identificado em sete amostras produtoras de toxina Shiga 1 (*Stx1*) (SALVADORI et al., 2003).

Aidar-Ugrinovich et al. (2007) estudaram STEC e EPEC isoladas de bezerros no estado de São Paulo. Os patótipos STEC e EPEC foram isolados em 12% e 2,6% dos casos com diarreia, respectivamente. Nos animais saudáveis, STEC e EPEC foram isoladas em 8,5% e 2,8% dos casos, respectivamente. Vinte seis por cento das STEC isoladas dos animais diarreicos e 25% das isoladas dos saudáveis, possuíam o gene *eae*.

Existem poucos trabalhos sobre a ocorrência de NTEC em bezerros no Brasil. Em um estudo realizado com amostras de *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia na região Centro-Oeste do Brasil, CNF1 foi detectado em uma amostra e CNF2 em nove de duzentas e cinco amostras pesquisadas (SALVADORI et al. 2003), indicando a presença do patótipo no Brasil.

1.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

E. coli que possuem genes de virulência são um importante agente causador de diarreias em bovinos, mas apenas o isolamento e identificação da bactéria nos casos de diarreia não significam que este agente é o causador da patologia, para tanto há a necessidade de classificar os isolados em patótipos. Até o presente momento, já foram identificados cinco patótipos de *E.*

coli associados a diarreia em bezerros: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC), sendo que outros patótipos diarreio gênicos para seres humanos, como *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) ainda não foram identificados como causadores de diarreia em bovinos. Além disso, os ruminantes são considerados os principais reservatórios de STEC/EHEC, importante patógeno para seres humanos. Deste modo é de fundamental importância o conhecimento sobre os patótipos e os fatores de virulência, bem como sua distribuição como agentes causadores de diarreia em bovinos.

A classificação dos isolados é importante para identificar tanto o patótipo envolvido na diarreia como a circulação de novos patótipos infectando bovinos. A vigilância e identificação dos diversos patótipos são de grande importância para estudo da patogênese e entendimento da relação hospedeiro parasita.

1.6. REFERÊNCIAS

ACRES, S. D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review. **Journal of dairy science**, v. 68, n. 1, p. 229–56, jan. 1985.

AIDAR-UGRINOVICH, L. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International journal of food microbiology**, v. 115, n. 3, p. 297–306, 20 abr. 2007.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396p

ANDRADE, G. I. 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, n. 7, p. 1783–90, out. 2012.

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.

BARTELS, C. J. M. et al. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive veterinary medicine**, v. 93, n. 2-3, p. 162–9, 1 fev. 2010.

BLANCHARD, P. C. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 28, n. 3, p. 443–64, nov. 2012.

BLANCO, M. et al. Distribution and characterization of faecal necrotoxicogenic *Escherichia coli* CNF1+ and CNF2+ isolated from healthy cows and calves. **Veterinary microbiology**, v. 59, n. 2-3, p. 183–92, 16 jan. 1998.

BLUMENTHAL, B. et al. The cytotoxic necrotizing factors from *Yersinia pseudotuberculosis* and from *Escherichia coli* bind to different cellular receptors but take the same route to the cytosol. **Infection and immunity**, v. 75, n. 7, p. 3344–53, jul. 2007.

BOQUET, P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. **Toxicon**, v. 39, n. 11, p. 1673–1680, 2001.

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

BURNS, A L.; BALL, H. J.; FINLAY, D. A. CNF producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Northern Ireland. **Veterinary microbiology**, v. 49, n. 3-4, p. 235–41, abr. 1996.

BUTLER, D.G.; CLARKE R.C. **Diarrhea and dysentery in calves**. In: Gyles, C.L. *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*. Walingford: CABI Publishing, 1994. 91–116p.

CASELANI, K. **Avaliação dos controles microbiológicos e do programa de redução de patógenos no abate de bovinos**. 2010. 123f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 infections associated with sprout consumption – Europe and North America, May–July 2011. **MMWR**, v. 62, p.1029-1031, 2013.

CERQUEIRA, A M. et al. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary microbiology**, v. 70, n. 1-2, p. 111–21, out. 1999.

CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, genetics and evolution**, v. 12, n. 2, p. 214–26, mar. 2012.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf populations in Belgium. **Veterinary microbiology**, v. 63, n. 2-4, p. 249–59, out. 1998.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli* © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . n. April, p. 71–87, 2012.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental microbiology reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, fev. 2013.

CLERMONT, O. et al. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 654–62, abr. 2011.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–8, out. 2000.

CLERMONT, O.; GORDON, D.; DENAMUR, E. A guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology**, v. 161, p. 980–988, 2015.

COURA, F. M. et al. Longitudinal study of Salmonella spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 3–11, 2015.

CROXEN, M. A; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26–38, jan. 2010.

DE RYCKE, J. et al. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 4, p. 694–9, abr. 1990.

DE RYCKE, J.; MILON, A.; OSWALD, E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. **Veterinary research**, v. 30, n. 2-3, p. 221–33, 1999.

DEBROY, C.; MADDOX, C. W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. **Animal health research reviews**, v. 2, n. 2, p. 129–40, dez. 2001.

FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 25, n. 1, p. 13–36, 2009.

GIRARD, F. et al. Adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157, O26, and O111 strains to bovine intestinal explants ex vivo. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, p. 3084–3090, 2007.

GORDON, D. M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2484–96, out. 2008.

GÜLER, L.; GÜNDÜZ, K.; OK, U. Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 5, p. 249–257, 2008.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of animal science**, v. 85, n. 13 Suppl, p. E45–62, mar. 2007.

GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: GYLES C.A., PRESCOTT J.F., SONGER J.G., THOEN C.O. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p.231-265.

HOLLAND, R. E. et al. Characterization of eae+ *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves. **Veterinary microbiology**, v. 66, n. 4, p. 251–63, maio 1999.

HOPKINS, A. M. Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 4, p. 725–742, 8 jan. 2003.

IRINO, K. et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 105, p. 29–36, 2005.

JOHNSON, T. J. et al. Pyrosequencing of the Vir plasmid of necrotogenic *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1-2, p. 100–109, 2010.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–40, fev. 2004.

KNUST, Z.; SCHMIDT, G. Cytotoxic necrotizing factors (CNFs)-a growing toxin family. **Toxins**, v. 2, n. 1, p. 116–127, 2010.

LAGE, A.P.; CARVALHO, A.C.T.; LEITE, R.C.; YANO, T.; SERAFIM, M.B. Toxigenic *Escherichia coli* in calves with diarrhea in Minas Gerais, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.45, p.352–359, 1993

LANGONI, H.; LINHARES, A.C.; AVILA, F.A.; DA SILVA, A.V.; ELIAS, A.O. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.41, p.313-319, 2004.

LEOMIL, L. et al. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 97, n. 1-2, p. 103–109, dez. 2003.

MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 152, n. 1-2, p. 2–12, 15 mar. 2013.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **Journal of applied microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1332–44, jan. 2005.

MENDONÇA, C.L.; LAZARO, N.S.; CASTRO, R.S; AFONSO, J.A.B.; HOFER, E. Occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* and Salmonella sp. in calves in the southern Agreste region of the State of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, p.127-131, 1996.

MOURA, C.; LUDOVICO, M.; VALADARES, G.F.; GATTI, M.S.V.; LEITE, D.S. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy feces of dairy calves in Brazil. **Arquivos Instituto Biológico**, v.79, p.273-276, 2012.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International journal of medical microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 443–54, out. 2005.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, jan. 1998.

OLIVEIRA FILHO, J.P.; SILVA, D.P.G.; PACHECO, M.D.; MASCARINI, L.M.; RIBEIRO, M.G.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; STIPP, D.T.; BARROS, B.J.P.; BORGES, A.S.

Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.419-424, 2007.

OLIVEIRA, M. G. et al. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **International journal of food microbiology**, v. 127, n. 1-2, p. 139–46, 30 set. 2008.

ORDEN, J. A et al. Prevalence and characteristics of necrotoxigenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. **Veterinary microbiology**, v. 66, n. 4, p. 265–73, maio 1999.

ORDEN, J.A. et al. Necrotoxigenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the eae and ehxA genes. **International Microbiology**, v.10, p.47–55, 2007.

POHL, P. et al. *Escherichia coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. **Veterinary research**, v. 24, n. 4, p. 311–315, 1993.

RADOSTITS, O.M. et al. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Philadelphia: Elsevier, 2007. 2156p.

RIGOBELLO, E.C.; GAMEZ, H.J.; MARIN, J.M.; MACEDO, C.; AMBROSIN, J.A.; ÁVILA, F.A. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária Zootecnia**, v.58, p.305-310, 2006.

SALVADORI, M. R. et al. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 230–235, 2003.

SALVARANI, S. et al. Occurrence and functionality of cycle inhibiting factor, cytotoxic necrotising factors and cytolethal distending toxins in *Escherichia coli* isolated from calves and dogs in Italy. **Research in veterinary science**, v. 92, n. 3, p. 372–7, jun. 2012.

STORDEUR, P. et al. Clinical signs, reproduction of attaching/effacing lesions, and enterocyte invasion after oral inoculation of an O118 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves. **Microbes and infection**, v. 2, n. 1, p. 17–24, jan. 2000.

VAN BOST, S. et al. Characteristics of necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970. **Veterinary microbiology**, v. 82, n. 4, p. 311–20, 1 out. 2001.

VAN BOST, S.; ROELS, S.; MAINIL, J. Necrotoxicogenic *Escherichia coli* type-2 invade and cause diarrhoea during experimental infection in colostrum-restricted newborn calves. **Veterinary Microbiology**, v. 81, n. 4, p. 315–329, 2001.

VAN BOST, S. et al. Putative roles of the CNF2 and CDTIII toxins in experimental infections with necrotoxicogenic *Escherichia coli* type 2 (NTEC2) strains in calves. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 13, p. 1189–1193, 2003.

2. CAPÍTULO 2: DETECÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE FEZES DE BEZERROS COM E SEM DIARREIA.

2.1. RESUMO

Este estudo teve como objetivo identificar os fatores de virulência, patótipos e grupos filogenéticos de amostras de *E. coli* isoladas de fezes de bezerros com e sem diarreia. A análise filogenética das 336 amostras de *E. coli* isoladas mostrou que 21 (6,25%) pertencem ao filogrupo A, 228 (67,85%) ao filogrupo B1, 2 (0,6%) ao filogrupo B2, 5 (1,49%) ao filogrupo C, 57 (16,96%) ao filogrupo E e 3 (0,9%) ao filogrupo F. O filogrupo D não foi identificado e vinte amostras (5,95%) foram designadas como filogrupo "desconhecido". A distribuição dos grupos filogenéticos de acordo com o patótipo mostrou que o patótipo NTEC pertence ao filogrupo B1 (17) e C (4); EPEC ao filogrupo B1 (6) e E (8); STEC ao filogrupo A (5), B1 (56), B2 (2), C (1), e E (15); EHEC ao filogrupo B1 (95) e E (5); ETEC ao filogrupo A (3), B1 (7) e E (10). Amostras positivas para EAST-1 foram classificadas nos filogrupos A (13), B1 (47), E (19) e F (3). As amostras de *E. coli* classificadas como "desconhecido" pertenciam aos patótipos EHEC (2), EPEC (1), EHEC (2) e STEC (7) e EAST-1 (6). Somente ETEC foi associada com a presença de diarreia ($P = 0,002$) e não houve associação entre o grupo filogenético de *E. coli* e a presença de diarreia ($P = 0,164$). NTEC foram classificadas principalmente como B1 e a Análise de Correspondência mostrou que EHEC e STEC são classificados principalmente como filogrupo B1, EAST-1 filogrupo A, ETEC e EPEC filogrupo E. A identificação de fatores de virulência e análise dos grupos filogenéticos de *E. coli* são ferramentas de moleculares úteis para o estudo da ocorrência de *E. coli* patogênica e, portanto, fornecem informações epidemiológicas sobre as infecções por *E. coli* em bezerros e as síndromes associadas. O presente estudo não encontrou uma associação entre o grupo filogenético e ocorrência de diarreia, mas identificou uma relação do grupo filogenético e o patótipo.

2.2. INTRODUÇÃO

A diarreia é uma síndrome clínica importante em bovinos jovens e tem uma etiopatogenia complexa, com a associação de diferentes agentes infecciosos, fatores do hospedeiro e fatores não infecciosos, como o ambiente, manejo e nutrição (BLANCHARD, 2012). A diarreia em bezerros resulta em importantes perdas econômicas na criação de bovinos jovens, pois causa perda de água e eletrólitos nesses animais, resultando em desidratação, desequilíbrios eletrolíticos, acidose metabólica e morte (BUTLER; CLARKE, 1994). Diversos enteropatógenos podem causar diarreia, com destaque para *Escherichia coli*, agente etiológico da colibacilose (BUTLER; CLARKE, 1994; BLANCHARD, 2012).

Escherichia coli patogênica tem sido identificada como uma das principais causas de diarreia em bovinos jovens (KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015). Além disso, ruminantes representam uma importante fonte de contaminação por EHEC (*E. coli*

enterohemorrágica) em alimentos (MARTIN; BEUTIN, 2011). EHEC, especialmente O157:H7, causa colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica em seres humanos, e os alimentos de origem animal contaminados são considerados a principal forma de transmissão da EHEC para os seres humanos (DOYLE, 1991).

Desde sua descoberta no final do século XIX por Theodor Escherich, *E. coli* tem sido vastamente estudada e utilizada, por ser uma bactéria “modelo” na área de biologia molecular e por constituir um grupo de organismo muito versátil, que engloba organismos comensais presentes no trato intestinal e organismos patogênicos que causam infecções diversas (HACKER; BLUM-OEHLER, 2007).

E. coli é um componente da microbiota intestinal normal e suas características fenotípicas e genotípicas permitem a identificação de estirpes de *E. coli* patogênicas ou patovares ou patotipos (CROXEN et al., 2013). Diferentes patotipos causam diarreia em bezerros, como ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EHEC, STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga) e NTEC (*E. coli* necrotoxigênica) (VAN BOST et al., 2003; MOXLEY; SMITH, 2010; COURA et al., 2015; KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015).

E. coli são bactérias Gram negativas, fermentativas, anaeróbias facultativas, cultivadas facilmente em meios de cultura de rotina. Comumente isoladas de fezes, na maioria das vezes *E. coli* são comensais, não causando doença em seus hospedeiros. Entretanto, em animais debilitados, imunocomprometidos ou com a barreira gastrointestinal alterada, amostras de *E. coli* não patogênicas presentes no intestino podem causar infecção (NATARO; KAPER, 1998).

As amostras de *E. coli* consideradas patogênicas podem ser classificadas em grupos ou patotipos de acordo com a presença de fatores de virulência e mecanismos pelos quais causam doença (NATARO; KAPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Já foram identificados cinco patotipos de *E. coli* associados a diarreia em bezerros: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* necrotoxigênica (NTEC). Outros patotipos diarreio gênicos para seres humanos, como *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC), ainda não foram confirmados como causadores de diarreia em bezerros (NATARO; KAPER, 1998; DEBROY; MADDOX, 2001; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

ETEC são caracterizadas por colonizarem a superfície da mucosa do intestino delgado, principalmente o íleo, e por produzirem enterotoxinas termoestáveis (ST) e termolábeis (LT) que alteram as funções dos enterócitos, aumentando a secreção e reduzindo a absorção de líquidos, sem induzirem alterações morfológicas significativas no intestino (NATARO; KAPER, 1998; NAGY; FEKETE, 2005). As infecções por ETEC são espécie-específicas principalmente em função da presença de receptores específicos para adesinas em células

intestinais de uma ou de um número limitado de espécies, não sendo, portanto, consideradas com zoonóticas, em contraste com as infecções por EHEC e STEC (NAGY; FEKETE, 2005). A maioria das ETEC que causam diarreia em bezerros é caracterizada por possuir as adesinas fimbriais F5 (K99) e F41 e por produzir STa (DEBROY; MADDOX, 2001).

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

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, EPEC podem 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 (NATARO; KAPER, 1998; BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

E. coli enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga toxina (STEC), também conhecida como *E. coli* verotoxigênica (VTEC), 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). Os genes que codificam Stx estão presentes e são transferidos por bacteriófagos para as amostras de *E. coli*. Stx possui uma estrutura A1B5, onde a subunidade B é responsável pela ligação da toxina a célula alvo e a subunidade A pela quebra do RNA ribossomal, resultando em inibição da síntese proteica, o que é letal para a célula (GYLES, 2007; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Algumas STEC além de produzirem Stx, possuem uma ilha de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE), cujos genes codificam os elementos responsáveis pela lesão intestinal A/E (*attaching and effacing*), como em EPEC, e por isso são denominadas *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Ruminantes não possuem esses receptores para Stx no endotélio vascular, mas os mesmos estão presentes nos enterócitos das criptas, linfócitos intraepiteliais e macrófagos da mucosa intestinal. EHEC/STEC também podem colonizar o intestino dos ruminantes, embora

não causem lesões vasculares e, por isso, sinais sistêmicos não são observados (MAINIL; DAUBE, 2005; MAINIL, 2013).

Outra toxina termo estável denominada EAST1 (*Enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin 1*), primariamente identificada em amostras de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), pode ser produzida por patótipos como ETEC, EPEC e EHEC (NAGY; FEKETE, 2005). EAST1 é o produto do gene *astA* que pode ser encontrado no cromossomo e/ou plasmídeos, em uma ou mais cópias. EAST1 é um peptídeo de 38 aminoácidos com peso molecular de 4,1 kDa. Já foi identificada em amostras de *E. coli* isoladas de bovinos e seres humanos com diarreia, e é considerada um determinante adicional na patogênese da diarreia (VEILLEUX; DUBREUIL, 2006).

Outros fatores de virulência já foram detectados em STEC/EHEC isoladas de bezerros, como a adesina não fimbrial Saa (STEC *autoagglutinating adhesin*) (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010; MAINIL, 2013). Outro fator de virulência já foi detectado em STEC/EHEC é a enterohemolisina (Ehx). Ehx pertence à família de toxinas RTX e sua ação resulta na formação de poros nas células alvo, mas sua contribuição na etiologia da diarreia não é totalmente conhecida (MAINIL; DAUBE, 2005; MAINIL, 2013). Proteínas codificadas fora da região LEE, como Saa, EAST1 e enterohemolisina, são fatores de virulência adicionais importantes a serem pesquisados. O conhecimento dos perfis de virulência de amostras de STEC LEE-negativas contribui para uma melhor compreensão do mecanismo de virulência deste grupo versátil de bactérias (GALLI et al., 2010).

Diversas adesinas tem sido estudadas em patótipos de *E. coli* isoladas de animais e seres humanos, como F17, iha (*IrgA homolog adhesin*), efa1 (*E. coli factor for adherence*), toxB (*toxin B*). Além desses, outros fatores de virulência característicos de EAEC, como Pet (*Plasmid-encoded toxin*), AggR (*transcriptional regulator*) e aaf (*aggregative adherence fimbriae*) foram poucos estudados em amostras de *E. coli* isoladas de bezerros (BARDIAU; SZALO; MAINIL, 2010; MAINIL, 2013).

NTEC são caracterizadas pela produção de toxinas CNF (fator necrotizante citotóxico) (DE RYCKE; MILON; OSWALD, 1998). A existência de dois tipos de CNF, tipo 1 e tipo 2 (CNF1 e CNF2), foi demonstrada em amostras de *E. coli* isoladas de bezerros, leitões e crianças com enterite (DE RYCKE et al., 1990). Ambos os tipos de citotoxinas são letais para camundongos quando inoculadas via intraperitoneal, compartilham a capacidade de induzir células gigantes multinucleadas em linhagem de células HeLa e necrose em pele de coelho, e são parcialmente relacionadas antígenicamente. Porém somente CNF2 induz necrose em pata de camundongo e produz acúmulo de fluido no teste da alça ligada de coelho (DE RYCKE et al., 1990). Recentemente foi identificada uma nova toxina necrotizante, denominada CNF3, de amostras de *E. coli* isoladas de ovinos e caprinos (ORDEN et al., 2007). NTEC2 é o patótipo

mais frequentemente isolado de bovinos com diarreia e septicemia (BURNS; BALL; FINLAY, 1996).

Surtos de doenças infecciosas e os organismos envolvidos são geralmente relacionados geneticamente e considerados clones, com origem comum. Organismos com relação clonal são membros da mesma espécie que compartilham fatores de virulência, características bioquímicas e genômicas. Mas existe diversidade genética no nível de espécie entre organismos isolados a partir de fontes diferentes, tempo e regiões geográficas distintas. O processo de tipagem molecular é importante epidemiologicamente para a determinação da fonte de infecção, o conhecimento de organismos virulentos e monitoramento de programas de vacinação. A tipagem bacteriana pode ser feita de diversas maneiras. Os estudos clássicos da diversidade bacteriana eram baseados em metodologias fenotípicas, como sorotipagem, fagotipagem, padrão de resistência a antibióticos e outros, muitas vezes limitados por não serem detectados em determinadas amostras, pela baixa reprodutibilidade e baixa capacidade de diferenciação entre estirpes de uma mesma espécie. As deficiências dos métodos de tipagem baseados fenotipicamente levaram ao desenvolvimento de métodos de tipagem baseado no genótipo bacteriano (OLIVE; BEAN, 1999).

O estudo da diversidade de *E. coli* antecede o surgimento da era molecular, com estirpes inicialmente distinguidas por sorotipagem, método que consiste na identificação de dos antígenos somáticos (O), capsulares (K) e flagelares (H). Porém, o sorotipo não se correlaciona com a diversidade genética dessa espécie, com amostras geneticamente distantes com o mesmo sorotipo e, inversamente, amostras estreitamente relacionadas de diferentes sorotipos. O conhecimento genético de *E. coli* iniciou-se com a aplicação do MLEE (*Multi-locus enzyme electrophoresis*) e progrediu com o surgimento do MLST (*Multi-locus sequence typing*) e acumulação de dados de sequências nucleotídicas. A acumulação dessas informações definiu sete grandes grupos filogenéticos, designados A, B1, B2, C, D, E e F. (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012; CLERMONT et al., 2013).

A tipagem filogenética permite que estirpes sejam classificadas em um dos sete filogrupos. Desde a sua introdução, em 2000 (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000), a tipagem filogenética utilizando a técnica de PCR tornou-se amplamente utilizada devido à sua simplicidade e rapidez. O método foi aprimorado em 2013 (CLERMONT et al., 2013) e por meio de uma PCR quadruplex é possível identificar os sete filogrupos. O MLST é a melhor técnica de tipificação de *E. coli*, mas o tipo de sequência (ST) fornecida na análise não permite a classificação direta em filogrupos sendo necessário determinar a correspondência entre ST e grupos filogenéticos, com esta última realizada por meio do "método de Clermont" (CLERMONT et al., 2013; CLERMONT; GORDON; DENAMUR, 2015). Além disso, MLST é uma técnica de alto custo e trabalhosa. A tipagem filogenética pela PCR tem 80-95% de correspondência com a análise por MLST, demonstrando que o teste pode ser utilizado para estudos de diversidade genética de amostras de *E. coli* (GORDON et al., 2008; CLERMONT et al., 2013).

Os estudos de tipagem filogenética mostraram que as estirpes pertencentes às diferentes filogrupos podem estar associadas a origem das amostras (CLERMONT et al., 2013). Os filogrupos A e B2 são os mais comuns em *E. coli* isoladas de seres humanos, sendo o B1 e D os menos prevalentes. Nos animais, amostras B1 são as mais prevalentes, seguidas de A, B2 e D (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012). Porém, pouco se sabe sobre as relações entre os grupos filogenéticos e especificidade de hospedeiros, e se esta variação na prevalência de grupos filogenéticos entre diferentes hospedeiros é devida à existência de amostras específicas a determinados hospedeiros (TENAILLON et al., 2010).

Para uma *E. coli* comensal tornar-se patogênica, não depende apenas da aquisição gene, mas também requer a presença de genes funcionais que contribuem diretamente para a patogenia, permitindo a colonização bem sucedida do hospedeiro (DOBRINDT, 2005). Os estudos sobre os grupos filogenéticos de *E. coli* demonstraram que diferentes filogrupos podem estar relacionados a diferentes síndromes clínicas. Por exemplo, amostras responsáveis por infecções extraintestinais pertencem mais aos filogrupos B2 e D do que A ou B1. Utilizando a PCR, com base na presença/ausência dos fragmentos de determinados genes, uma cepa de *E. coli* pode ser atribuída a um dos sete principais filogrupos, A, B1, B2, C, D, E e F e o que forneceria evidência adicional sobre as características genotípicas das amostras, seu nicho ecológico e capacidade de causar doenças (CLERMONT et al., 2013).

Em função da diversidade genotípica de *E. coli* e da importância dos patótipos na etiologia da diarreia em bezerros, é fundamental caracterizar isolados de *E. coli* obtidos de bezerros com e sem diarreia para determinar fatores de virulência que possam estar envolvidos no surgimento ou não da diarreia, além de caracterizar faixas etárias mais suscetíveis. Pouco se sabe sobre a importância de determinados fatores de virulência e patótipos de *E. coli* diarreiogênicas para bovinos jovens, e menos ainda se conhece sobre a frequência de grupos filogenéticos nessa espécie e entre os diversos patótipos, e sua importância na etiologia da diarreia.

E. coli consistem de amostras comensais e patogênicas de grande diversidade, e o estudo desse microrganismo é importante para o entendimento da patogênese, ecologia e interação com seus hospedeiros de *E. coli* (CROXEN et al., 2013) e a caracterização filogenética é uma ferramenta que auxilia nesse entendimento (TENAILLON et al., 2010). Portanto, esse estudo propõe pesquisar outros fatores de virulência de isolados de *E. coli* obtidos no estudo de Coura et al. (2015), identificar os patótipos e grupos filogenéticos e a associação entre a presença de diarreia, os patótipos e os grupos filogenéticos de *E. coli*.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* E CARACTERIZAÇÃO

As amostras de *E. coli* utilizadas no presente estudo foram obtidas por Coura et al. (2015). A coleta do material fecal foi realizada em uma propriedade particular, localizada no município de Martinho Campos, microrregião de Bom Despacho, no estado de Minas Gerais situado à 19° 19' de latitude S e 45° 14' de longitude W, a altitude média de 674 metros acima do nível do mar. Foram coletadas amostras fecais de bezerras leiteiras da raça Girolando, com pesos médios de $35,42 \pm 2,87$ (32 a 41 kg). Todos os animais nasceram na propriedade entre os meses de junho a agosto de 2008, em piquetes maternidade localizado a, aproximadamente, 600 m das instalações do bezerreiro.

A coleta das fezes foi realizada com auxílio de sacos plásticos limpos, diretamente da ampola retal de cada animal, e foram mantidas resfriadas (4°C) até o envio para o laboratório. As amostras fecais foram enviadas semanalmente em caixas de isopor com gelo, para o Laboratório de Gastrenterites Transmissíveis dos Animais da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

Os animais foram acompanhados do nascimento até no mínimo 60 dias de idade. Foram coletadas fezes de 67 bezerras, totalizando 850 amostras, 312 diarréicas e 538 normais. A primeira amostra de cada bezerra foi coletada com 24-48 h de vida e subsequentemente em intervalos semanais, até pelo menos 60 dias de idade. Durante o experimento, todo animal que teve diarreia, teve amostras de fezes coletadas de todo o episódio de diarreia até o final deste. As fezes foram consideradas diarréicas quando no momento da coleta apresentavam-se pastosas a liquefeitas. E normais quando se apresentavam firmes e bem formadas.

No laboratório, as fezes foram diluídas na proporção 1:4 em tampão de estabilização para rotavírus (Tris-HCL 50 mM, CaCl₂ 13 mM). Parte da suspensão fecal (3 mL) foi acondicionada em tubo tipo eppendorf® de 1,5 mL e armazenada a -20°C, para posterior exame virológico. Para a pesquisa de *E. coli*, um mL da suspensão fecal foi transferido para meio não seletivo de pré-enriquecimento (água peptonada) e incubado a 37°C por 18-24 h. Com auxílio de alça flambada, as amostras foram repicadas em ágar MacConkey, para isolamento de *E. coli*, e as placas incubadas na estufa à 37°C.

Foram selecionadas até três colônias isoladas de cada placa e que apresentavam aspecto morfológico sugestivo de *E. coli* para identificação através de provas bioquímicas (QUINN et al., 1994). Os isolados identificados foram armazenados em meio de manutenção, à temperatura ambiente. Os fatores de virulência de *E. coli* foram identificados através da técnica de PCR multiplex utilizando pares de *primers* destinados a detecção dos genes codificadores para *K99*, *F41*, intimina (*eae*), toxina Shiga 1 e 2 (*Stx1* e *Stx2*, respectivamente) e toxina termo-estável a (*Stx*) (FRANCK; BOSWORTH; MOON, 1998).

Os isolados de *E. coli* foram classificados em patótipos de acordo com seus fatores de virulência (Tabela 1.1). As amostras de *E. coli* foram isoladas de 850 amostras fecais coletadas de 67 bezerras em Minas Gerais. Em todas as fezes pesquisadas, pelo menos uma colônia *E. coli* foi isolada e identificada por testes bioquímicos, totalizando 1983 colônias.. Isolados positivos para os fatores de virulência K99 e/ou F41 e STa foram denominados de ETEC, para Stx1 ou Stx2 de STEC, para *eae* de EPEC, para Stx1 e/ou Stx2 e *eae* de EHEC (COURA et al., 2015).

Os isolados de *E. coli* armazenados em meio de manutenção foram plaqueados em ágar MacConkey e incubados por 18-24 h a 37°C. Em seguida, a massa bacteriana foi suspensa em 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl; EDTA 1 mM, pH 8,0) em microtubos de 1,5 mL e o DNA foi extraído de acordo com Pitcher et al. (1989).

No presente trabalho, outros fatores de virulência foram estudados utilizando uma PCR para a detecção dos genes de virulência. A PCR foi realizada para EAST-1 (*astA*) (YAMAMOTO; NAKAZAWA, 1997) em todas as colônias de *E. coli* e se positivas, as amostras foram selecionadas para a pesquisa de AggR (*aggR*), AAF-II (*aafA*) e Pet (*pet*) (TOKUDA et al., 2010).

Todos os isolados de *E. coli* também foram testados para CNF2 (BLANCO et al., 1996) e, se positivos, foram avaliados para a fímbria F17 (BERTIN et al., 1996).

Amostras identificadas como EHEC, STEC e EPEC foram testadas para as adesinas Iha (*iha*), *efa1* (*efa1*) e Toxina B (*toxB*) (TATARCZAK et al., 2005).

Os patótipos EHEC e STEC foram testadas quanto à presença de hemolisina (*ehxA*) (SCHMIDT; BEUTIN; KARCH, 1995). STEC foram avaliadas para a presença da adesina autoaglutinante de STEC (*saa*) (JENKINS et al., 2003) e EPEC para *bundle-forming pilli* (*bfpA*) (GUNZBURG; TORNIEPORTH; RILEY, 1995).

As seguintes amostras de referência de *E. coli* foram utilizados como controles positivos: EDL933 (O157:H7, *eaeA*, *stx1*, *stx2*, *ehxA*, *iha*, *toxB*, *efa1*), EAEC O42 (*astA*, *aggR*, *aaf*, *pet*), S5 (F17, CNF2), STECLBA05 (*saa*), E2348 / 69 (*bfpA*, *eae*).

Água esterilizada foi utilizada como controle negativo. O DNA amplificado foi resolvido em gel de agarose a 1,5%, corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio e fotografado sob luz UV.

Na tabela 2.1 estão apresentadas as sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados, os respectivos tamanhos de fragmento amplificados esperados e temperaturas de anelamento para iniciadores dos fatores de virulência pesquisados por PCR.

Tabela 2.1. Fatores de virulência de *E. coli*, seqüências de nucleotídeos dos primers utilizados, tamanho de fragmento amplificado esperado, temperatura de anelamento para iniciadores utilizados e referência bibliográfica.

Fatores de Virulência	Seqüência dos Iniciadores Posição 5'- 3'	Amplicon (pb)	Temperatura anelamento	Referência
EAST-1(F)	CCATCAACACAGTATATCCGA	111	55°C	YAMAMOTO; NAKAZAWA, 1997
EAST-1 (R)	GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT			
EhlxA (F)	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTA G	1551	58°C	SCHMIDT; BEUTIN; KARCH, 1995
EhlxA (R)	TCTCGCCTGATAGTGTTTGGTA			
Saa (F)	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	58°C	JENKINS et al., 2003
Saa (R)	ATGGACATGCCTGTGGCAAC			
CNF2 (F)	AATCTAATTAAGAGAAC	543	46°C	BLANCO et al., 1996
CNF2 (R)	CATGCTTTGTATATCTA			
AggR (F)	CAGAATACATCAGTACACTG	433	54°C	TOKUDA et al., 2010
AggR (R)	GAAGCTTACAGCCGATATAT			
AAF-II (F)	TGCGATTGCTACTTTATTAT	242	54°C	TOKUDA et al., 2010
AAF-II (R)	ATTGACCGTGATTGGCTTCC			

Pet (F)	ACTGGCGGACTCATTGCTGT	832	54°C	TOKUDA et al., 2010
Pet (R)	GCGTTTTTCCGTTCCCTATT			
F17 (F)	GCAGAAAATTCAATTTATCCTT GG	537	55°C	BERTIN et al., 1996
F17 (R)	CTGATAAGCGATGGTGTAATTA AC			
Iha (F)	CAGTTCAGTTTCGCATTACCC	1.305	58°C	TATARCZA K et al., 2005
Iha (R)	GTATGGCTCTGATGCGATG			
Efa1 (F)	GAGACTGCCAGAGAAAG	479	58°C	TATARCZA K et al., 2005
Efa1 (R)	GGTATTGTTGCATGTTTCAG			
Toxina B (F)	ATACCTACCTGCTCTGGATTGA	602	58°C	TATARCZA K et al., 2005
Toxina B (R)	TTCTTACCTGATCTGATGCAGC			
BFP (F)	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC	326	56°C	GUNZBURG; TORNIEPORTH; RILEY, 1995
BFP (R)	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA			

2.3.2. TIPAGEM FILOGENÉTICA

E. coli positivas para um ou mais fatores de virulência pesquisados por PCR foram testados para os genes *chuA*, *yjaA*, *arpA*, *trpA* e o fragmento de DNA TSPE4.C2, por meio de uma PCR, para caracterização em grupos filogenéticos de acordo com Clermont et al. (2013). Na tabela 2.2 estão os genes pesquisados, a sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados e os respectivos tamanhos de fragmento amplificados esperados.

Tabela 2.2. Genes pesquisados, seqüências de nucleotídeos dos *primers* e respectivos tamanhos de fragmento amplificados esperados.

Reação PCR	Alvo	Sequencia iniciadores Posição 5' - 3'	Amplicon (pb)
Quadruplex	<i>chu A</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288
	<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTTCAGGAG AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211
	TspE4.C2	-CACTATTTCGTAAGGTCATCC AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	152
	<i>arpA</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC TCTCCCCATACCGTACGCTA	400
Grupo E	<i>arpA</i>	GATTCCATCTTGTCAAATATGCC GAAAAGAAAAAGAATCCCAAGAG	301
Grupo C	<i>trpA</i>	AGTTTTATGCCAGTGCGAG TCTGCGCCGGTCACGCC	219

Todas as reações de PCR foram realizadas em um volume de 20 µL contendo 100 ng de DNA, 0,2 mM da cada dNTP, 1x Green GoTaq™ Reaction Buffer, 2 U GoTaq™ DNA Polymerase (Promega), e 1 µM de cada primer, exceto os primers do gene *arpA* do quadruplex, no qual foi utilizado 2 µL. As reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação de 4 min a 94 ° C, 30 ciclos de 20 s a 94 ° C, 20 s a 57 ° C (Grupo E) ou 59 ° C (quadruplex e o grupo C) e 25 s a 72° C, e um passo de extensão final de 5 min a 72 ° C. Dez microlitros do produto de reação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1X, corado com brometo de etídio a 0,1 µg/µL e observados sob luz ultravioleta. Um marcador de de tamanho de 100 bp foi utilizado para comparação do tamanho das bandas geradas na eletroforese.

A primeira etapa da tipagem é feita uma PCR quadruplex. A partir da presença/ausência dos genes na ordem *arpA/chuA/yjaA/TspE4.C2* é determinado o filogruppo ou testes adicionais são necessários para diferenciar em grupo C ou E, conforme ilustrado na tabela 2.3. Se nenhum dos genótipos se encaixarem na classificação, é necessário fazer MLST para identificação do filogruppo. No nosso estudo, optamos por fazer a confirmação genética da espécie *E. coli* utilizando os primers para *uidA* (MCDANIELS et al., 1996).

Tabela 2.3: Genótipos e etapas necessárias para a atribuição de *Escherichia coli* a um filogrupo (Adaptado de CLERMONT et al., 2013).

arpA (400pb)	chuaA (288pb)	yjaA (211 pb)	TspE4.C2 (152pb)	Filogrupo	Próximo passo
+	-	-	-	A	-
+	-	-	+	B1	-
-	+	-	-	F	-
-	+	+	-	B2	-
-	+	+	+	B2	-
-	+	-	+	B2	-
+	-	+	-	A ou C	Confirmar com primers para C (<i>trpA</i>)
+	+	-	-	D ou E	Confirmar com primers para E (<i>arpA</i>)
+	+	-	+	D ou E	Confirmar com primers para E
+	+	+	-	E ou Clade I	Confirmar com primers para E
-	-	+	-	Clade I ou II	Confirmar com primers clade
-	-	-	-	Clade III, IV ou V	Confirmar com primers clade
-	-	-	+	Desconhecido	Realizar MLST
-	-	+	+	Desconhecido	Realizar MLST
+	-	+	+	Desconhecido	Realizar MLST
+	+	+	+	Desconhecido	Realizar MLST
-	-	-	-	Desconhecido	Realizar MLST

2.3.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados no programa Stata[®]/SE 12.0 (STATA CORP, 2011) e os gráficos foram produzidos com ajuda de planilha de cálculo utilizando o programa Microsoft[®] Office Excel[®] 2010.

Foram estudados associação entre a ocorrência de diarreia, patótipos e filogrupos usando o teste do qui-quadrado. Os resultados foram expressos como cada valor de P. O resultado foi considerado como sendo significativo na $P \leq 0,05$. A idade de bezerros foi identificada (COURA et al., 2015) e as amostras fecais coletadas a partir desses animais foram agrupadas de acordo com sua idade. Amostras de fezes foram agrupadas de acordo com a idade de bezerros da seguinte forma: 1-7, 8-14, 15-21, 22-28, 29-35, 36-42, 43-49, 50-56, 57-70 e dias de idade.

A análise de correspondência (GREENACRE; BLASIUS, 2006) foi usada para estudar as variáveis categóricas patótipo e filogrupo. Nas análises de correspondência, a relação entre as categorias foram representados num gráfico bidimensional. A relação entre os patótipos e os filogrupos foi demonstrada por visualização no gráfico de quais variáveis foram agrupadas ou plotadas mais próxima uma da outra.

2.3.4. PROTOCOLO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Esse estudo foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (CETEA/UFMG, número de protocolo 145/2006).

2.4. RESULTADOS

No total, 336 amostras de *E. coli* foram positivas para os fatores de virulência avaliados na análise de PCR e usadas no estudo. Os fatores de virulência, o número de amostras de *E. coli* isoladas a partir de fezes diarreicas e normais estão na Figura 2.1. De acordo com os fatores de virulência e as suas combinações, foi realizada a classificação de *E. coli* em patótipos.

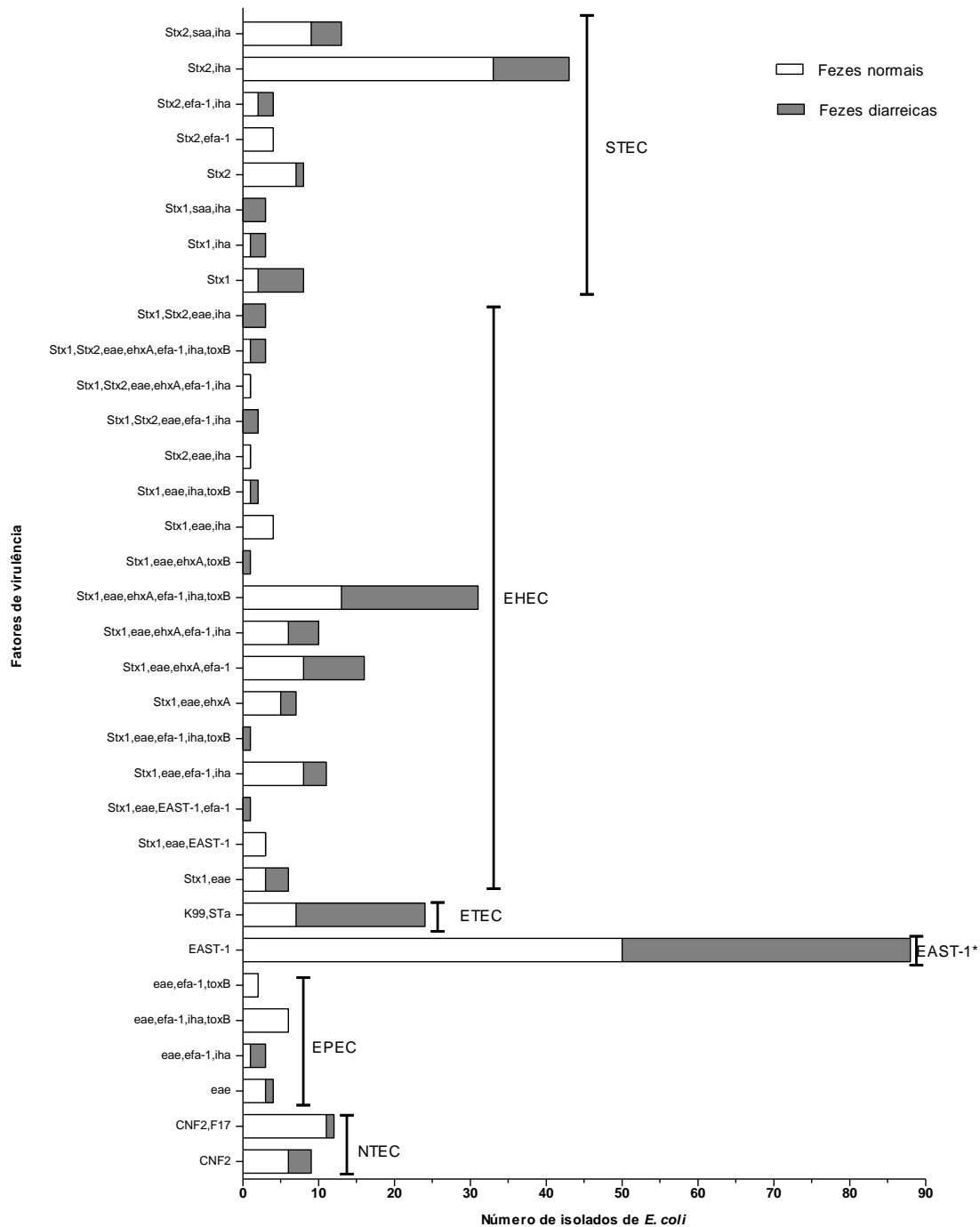


Figura 2.1: Fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes normais e diarreicas de bezerros em Minas Gerais, Brasil. As linhas indicam a classificação em patótipos. * EAST-1: amostras positivas para EAST-1 somente.

EAST-1 foi identificada como o único fator de virulência em 88 amostras de *E. coli* e em quatro amostras do patótipo EHEC. Os genes de virulência *aggR*, *aaf* e *pet* de *E. coli*

Enteroagregativa (EAEC) não foram detectados em amostras positivas para EAST-1 e, portanto, estas estirpes não foram consideradas do patotipo EAEC e foram designados como amostras "EAST-1". Todas as amostras de EPEC foram negativas para *bfpA* e enterohemolisina foi identificada somente em amostras de EHEC. Todas as STEC foram negativas para *toxB*. O número de amostras de amostras de *E. coli* de acordo com o patotipo e a faixa etária dos bezerros com e sem diarreia estão na Figura 2.2. Somente ETEC teve associação com a presença de diarreia (P = 0,002).

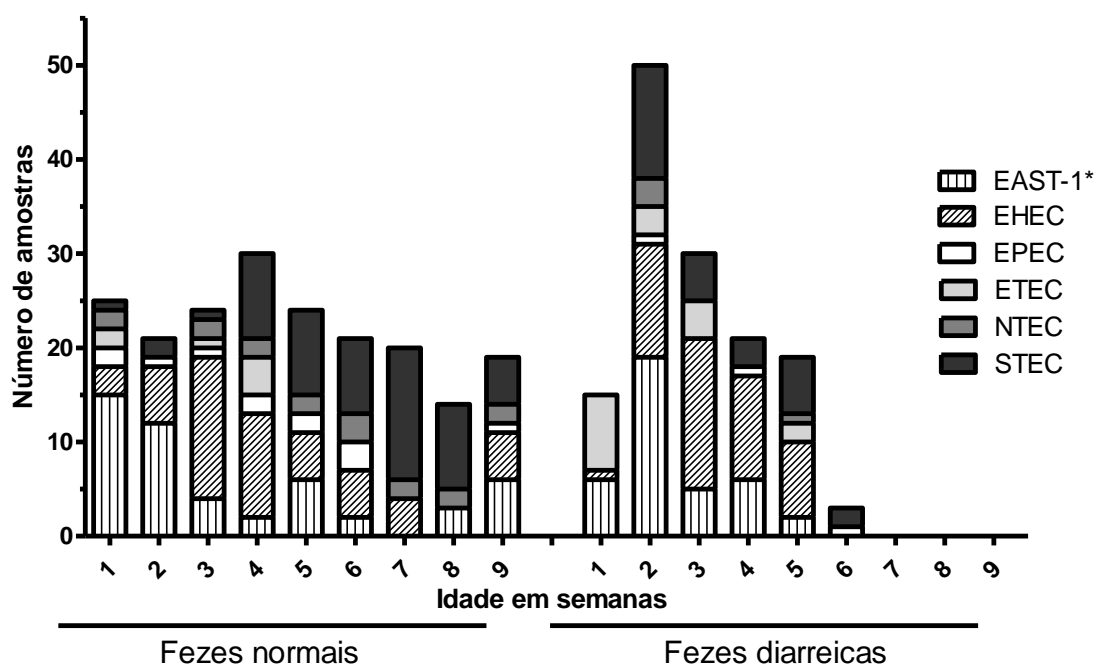


Figura 2.2: Distribuição dos patótipos de *E. coli* isolados de fezes normais e diarreicas de bezerros de acordo com a faixa etária.

* EAST-1: amostras positivas para EAST-1 somente.

A análise filogenética das 336 amostras de *E. coli* isoladas de fezes de bezerros mostrou que 21 (6,25%) pertencem ao filogruppo A, 228 (67,85%) ao filogruppo B1, 2 (0,6%) ao filogruppo B2, 5 (1,49%) ao filogruppo C, 57 (16,96%) ao filogruppo E e 3 (0,9%) ao filogruppo F. O filogruppo D não foi identificado. Vinte amostras (5,95%) foram designadas como filogruppo "desconhecido", porque foram positivas para *arpA/chuA/yjaA/TspE4.C2* ou positivas para *arpA/yjaA/TspE4.C2*. Essas amostras foram testadas para o gene *uidA*, confirmando a detecção genética de *E. coli*. Não houve associação entre o grupo filogenético de *E. coli* e a presença de diarreia (P = 0,164).

A identificação dos filogrupos de acordo com o patotipo mostrou que o patotipo NTEC pertence aos filogrupos B1 (17) e C (4); EPEC aos filogrupos B1 (6) e E (8); STEC aos filogrupos A (5), B1 (56), B2 (2), C (1) e E (15); EHEC aos filogrupos B1 (95) e E (5); ETEC aos filogrupos A (3), B1 (7) e E (10). Amostras EAST-1 foram classificadas como filogrupos A (13), B1 (47), E (19) e F (3); *E. coli* do filogrupo "desconhecido" foi identificado nos patotipos EHEC (2), EPEC (1), EHEC (2) e STEC (7) e EAST-1 (6).

A análise de correspondência foi realizada para avaliar a relação entre os patotipos e os grupos filogenéticos de *E. coli* (Figura 2.3). A análise de correspondência explica 93,46% da variação total, com 55,06% explicado pela primeira dimensão, 26,21% pela segunda dimensão e 12,19% pela terceira dimensão. Amostras EAST-1 positivas (EAEC) foram plotadas perto do filogrupo A; EPEC ficaram perto do filogrupo E; STEC e EHEC foram plotadas no gráfico perto do filogrupo B1; ETEC ficaram perto do filogrupo E.

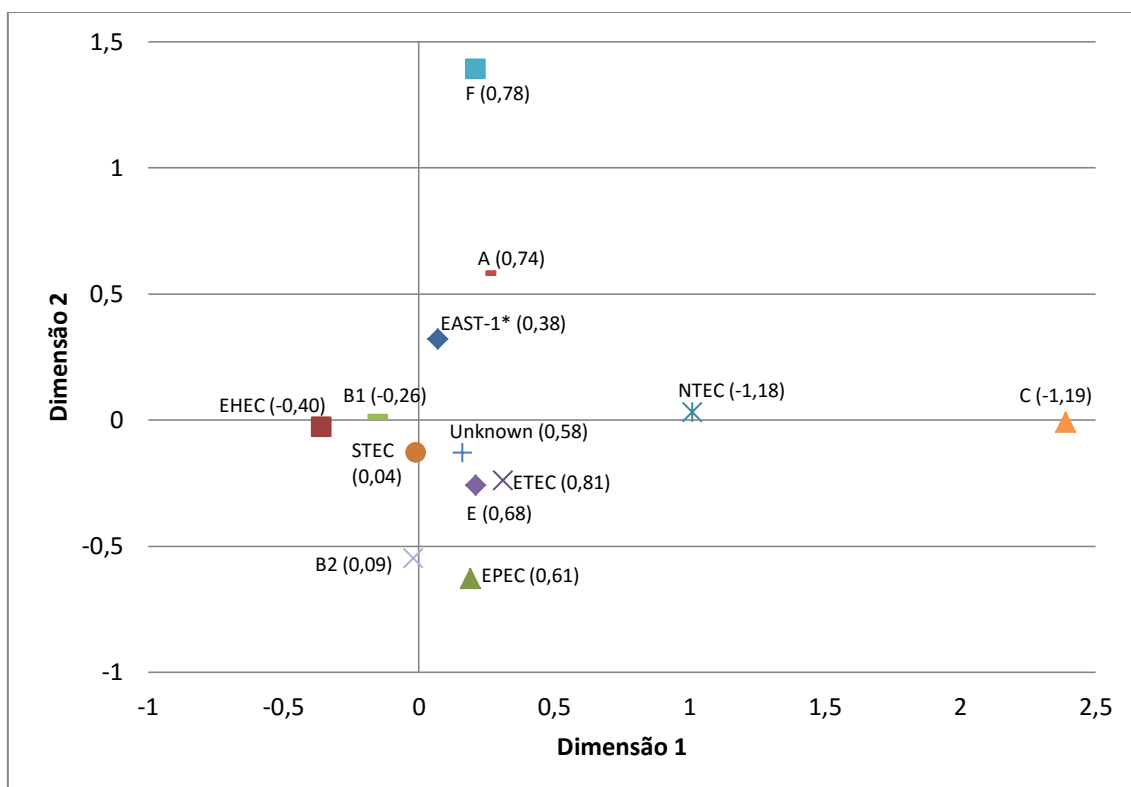


Figura 2.3: Análise de Correspondência para as categorias analisadas. A representação bidimensional explica 93,46% de variação total, com 55,06% explicada pela primeira dimensão, 26,21% pela segunda dimensão e 12,19% pela terceira dimensão. O valor da terceira dimensão é mostrado entre parênteses.

2.5. DISCUSSÃO

A diarreia é uma síndrome complexa que envolve diferentes agentes patogênicos. A prevenção e o controle da síndrome são baseados na compreensão da relação entre os múltiplos fatores e como eles interagem (SMITH, 2012). *E. coli* é uma importante causa de diarreia em bezerros, sendo responsável por perdas econômicas na produção pecuária mundial (KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015).

Existem alguns relatos no Brasil sobre a ocorrência de patótipos de *E. coli* isoladas de bezerros (LANGONI et al., 2004; AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; ANDRADE et al., 2012; COURA et al., 2015). Estudos realizados no Brasil e em outros países com amostras de *E. coli* isoladas de bezerros que pesquisaram fatores de virulência de EAEC, adesinas iha, toxB and efa-1 de EHEC, STEC and EPEC, enterohemolisina e saa de EHEC e STEC são escassos (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; BADOUEI et al., 2010; GALLI et al., 2010; KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015) e a maioria destes trabalhos não analisaram amostras fecais de bezerros diarreicos e não diarreicos. Além disso, a distribuição dos grupos filogenéticos entre amostras de *E. coli* de diferentes patótipos isoladas de bezerros com e sem diarreia não foi realizado.

Amostras de *E. coli* positivas para EAST-1 foram negativas para fatores de virulência adicionais de EAEC. EAEC causam diarreia em seres humanos e estudos sobre o patótipo EAEC de origem bovina são raros (UBER et al., 2006; CROXEN et al., 2013). Os resultados indicam que os genes de virulência *aafA*, *pet* and *aggR* não estão presentes em *E. coli* positivas para EAST-1 isolada de fezes de bezerros, reforçando que o bovino não é um reservatório de EAEC (UBER et al., 2006; CROXEN et al., 2013). EAST-1 foi identificada em estirpes de *E. coli* isoladas de suíno, bovino e seres humanos com diarreia (VEILLEUX; DUBREUIL, 2006). Apesar de a toxina ter sido detectada em amostras de *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia em uma alta frequência, não foi encontrada uma relação com a ocorrência da diarreia, e o papel da EAST-1 na patogênese da diarreia em bezerros ainda não está clara (KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015).

EPEC foi detectada em frequência baixa e foram todas negativas para *bfpA*, sendo classificadas como EPEC atípica. Esse resultado está de acordo com outros estudos, sugerindo que EPEC não é frequente em bezerros (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; NGUYEN; VO; VU-KHAC, 2011; ANDRADE et al., 2012). ETEC foi associada com a ocorrência de diarreia, resultado esperado, já que ETEC é uma importante causa de diarreia em bezerros (BARTELS et al., 2010; ANDRADE et al., 2012; COURA et al., 2015).

Saa foi detectada apenas em amostras de STEC, enquanto enterohemolisina foi detectada apenas em amostras EHEC. Estudos mostram que Saa é encontrada apenas em amostras *eae*-negativas (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; BARDIAU; SZALO; MAINIL,

2010; PATON et al., 2001). Saa e hemolisinas são fatores de virulência de *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia, porém ambos são detectados em amostras de STEC (OLIVEIRA et al., 2008; AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; GALLI et al., 2010; KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015), resultados que diferem dos nossos.

O perfil mais comum de virulência de amostras STEC foi *stx2/iha* e de EHEC foi *stx1/eae/ehxA/efa-1/iha/toxB*. Há poucos relatos sobre adesinas de STEC e EHEC, mas os estudos mostram que o perfil de virulência *stx/ehxA/eae* (BADOUEI et al., 2010; ETCHEVERRÍA; PADOLA, 2013), *stx2* (GALLI et al., 2010) e *stx/ehxA/iha/saa* (OLIVEIRA et al., 2008) são comuns em amostras de *E. coli* de origem bovina. *toxB* não foi detectada em isolados de STEC e estudos sugerem que *toxB* é encontrado principalmente amostras *eae* positivas (TOMA et al., 2004; TATARCZAK et al., 2005).

NTEC foi isolada de fezes diarreicas e não diarreicas. *E. coli* produtora de CNF2 é pode induzir a diarreia e septicemia em bezerros infectados oralmente (VAN BOST; ROELS; MAINIL, 2001). Uma revisão sistemática e meta-análise mostrou que CNF é 1,8 vezes mais isolada de bezerros com diarreia do que bezerros não diarreicos (KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015). Em nosso estudo, embora NTEC tenha sido isolada e identificada, não foi encontrada uma associação entre a presença de diarreia e o patotipo, mas a alta frequência de isolamento indica que NTEC está presente e deve ser considerado um patotipo de *E. coli* isolado de bezerros.

O método baseado em PCR para identificar os sete grupos filogenéticos foi recentemente desenvolvido (CLERMONT et al., 2013), e por isso ainda é pouco utilizada na literatura. A análise filogenética mostrou que B1 é o filogrupo mais comum de *E. coli* isolada de bezerros, seguido pelo filogrupo E. Nossos resultados estão de acordo com outros que demonstraram que filogrupo B1 encontra-se predominantemente em mamíferos herbívoros (BALDY-CHUDZIK; MACKIEWICZ; STOSIK, 2008). O filogrupo D não foi identificado e o filogrupo B2 foi detectado apenas em dois isolados, sugerindo que *E. coli* isoladas a partir de fezes de bezerros não carregam característica extraintestinal, pois amostra ExPEC estão agrupadas principalmente nos filogrupos B2 e D (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004).

A análise de correspondência mostrou que amostras EAST-1 positivas são principalmente do filogrupo A; EPEC são do filogrupo E; STEC e EHEC são do filogrupo B1; ETEC são do filogrupo E. Trabalhos sugerem que amostras de *E. coli* comensais são principalmente do filogrupo A e amostras de *E. coli* diarreiogênicas são principalmente do filogrupo B1 (MOSQUITO et al., 2015). Clermont et al. (2011) mostraram que *E. coli* patogênicas intestinais são em sua maioria dos filogrupos A, B1 e E. Esses resultados em conjunto com os nossos indicam que *E. coli* isolada de fezes de bezerros pertencem a filogrupos associados a infecções intestinais.

O estudo fornece informações importantes sobre fatores de virulência e características filogenéticas de *E. coli* patogênica. A identificação de fatores de virulência e análise filogenética são ferramentas de epidemiologia molecular úteis no estudo da ocorrência de *E. coli* e, portanto, fornecem informações epidemiológicas da ocorrência de infecções de *E. coli* em bezerros e as síndromes associadas. Nosso estudo não encontrou uma associação entre o *background* filogenético e ocorrência de diarreia, mas identificou uma relação do grupo filogenético e o patotipo: EHEC e STEC são classificados principalmente como filogrupo B1, EAEC como filogrupo A, ETEC e EPEC como filogrupo E.

2.6. REFERÊNCIAS

AIDAR-UGRINOVICH, L. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 297–306, 20 abr. 2007.

ANDRADE, G. I. 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, n. 7, p. 1783–90, out. 2012.

BADOUEI, M. A. et al. Virulence gene profiles and intimin subtypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrhoeic calves. **The Veterinary Record**, v. 167, n. 22, p. 858–861, 2010.

BALDY-CHUDZIK, K.; MACKIEWICZ, P.; STOSIK, M. Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 1-2, p. 173–184, 2008.

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.

BARTELS, C. J. M. et al. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, n. 2-3, p. 162–9, 1 fev. 2010.

BERTIN, Y. et al. Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 2921–2928, 1996.

BLANCHARD, P. C. Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 28, n. 3, p. 443–64, nov. 2012.

BLANCO, M. et al. Polymerase chain reaction for detection *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, p. 95–101, 1996.

BURNS, A L.; BALL, H. J.; FINLAY, D. A. CNF producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Northern Ireland. **Veterinary Microbiology**, v. 49, n. 3-4, p. 235–41, abr. 1996.

BUTLER D.G. & CLARKE R.C. 1994. **Diarrhea and dysentery in calves**. In: Gyles C.L. (Ed) *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CABI Publishing, Walingford. 91–116p.

CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, genetics and evolution**, v. 12, n. 2, p. 214–26, mar. 2012.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental microbiology reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, fev. 2013.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–8, out. 2000.

CLERMONT, O.; GORDON, D.; DENAMUR, E. A guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology**, v. 161, p. 980–988, 2015.

COURA, F. M. et al. Longitudinal study of Salmonella spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 3–11, 2015.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

DE RYCKE, J. et al. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 694–9, abr. 1990.

DE RYCKE, J.; MILON, A.; OSWALD, E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. **Veterinary Research**, v. 30, n. 2-3, p. 221–33, 1998.

DEBROY, C.; MADDOX, C. W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. **Animal Health Research Reviews**, v. 2, n. 2, p. 129–40, dez. 2001.

DOBRINDT, U. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology: IJMM**, v. 295, n. 6-7, p. 357–71, out. 2005.

DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 289–301, 1991.

ESCOBAR-PÁRAMO, P. et al. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 6, p. 1085–1094, 2004.

ETCHEVERRÍA, A. I.; PADOLA, N. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 366–72, 2013.

GALLI, L. et al. Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from cattle and humans. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 2-4, p. 307–13, 14 jul. 2010.

GORDON, D. M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2484–96, out. 2008.

GREENACRE, M.; BLASIUS, J. **Multiple Correspondence Analysis and Related Methods**. Florida: ChapmanHall. 2006

GUNZBURG, S. T.; TORNIÉPORTH, N. G.; RILEY, L. W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1375–1377, 1995.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 13 Suppl, p. E45–62, mar. 2007.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C.A., PRESCOTT J.F., SONGER J.G. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, p. 231-265.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G. In appreciation of Theodor Escherich. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 902–902, 2007.

JENKINS, C. et al. Distribution of the saa gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1775–8, abr. 2003.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–40, fev. 2004.

KOLENDA, R.; BURDUKIEWICZ, M.; SCHIERACK, P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. March, 2015.

LAGE, A.P.; CARVALHO, A.C.T.; LEITE, R.C.; YANO, T.; SERAFIM, M.B. Toxigenic *Escherichia coli* in calves with diarrhea in Minas Gerais, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.45, p.352–359, 1993

LANGONI, H. et al. Contribuição ao estudo da etiologia das diarreias em bezerros de aptidão leiteira no estado de São Paulo , Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 313–19, 2004.

MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1-2, p. 2–12, 15 mar. 2013.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1332–44, jan. 2005.

MARTIN, A.; BEUTIN, L. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 1, p. 99–104, 2011.

MCDANIELS, A. E. et al. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and β -D-glucuronidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3350–3354, 1996.

MENDONÇA, C.L.; LAZARO, N.S.; CASTRO, R.S; AFONSO, J.A.B.; HOFER, E. Occurrence of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. in calves in the southern Agreste region of the State of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.16, p.127-131, 1996.

MOSQUITO, S. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* Phylogroups Are Associated with Antibiotic Resistance and Duration of Diarrheal Episode. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

MOURA, C.; LUDOVICO, M.; VALADARES, G.F.; GATTI, M.S.V.; LEITE, D.S. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy feces of dairy calves in Brazil. **Arquivos Instituto Biológico**, v.79, p.273-276, 2012.

MOXLEY, R. A; SMITH, D. R. Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 26, n. 1, p. 29–56, table of contents, mar. 2010.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 443–54, out. 2005.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, jan. 1998.

NGUYEN, T. D.; VO, T. T.; VU-KHAC, H. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. **Journal of Veterinary Science**, v. 12, n. 2, p. 159–164, 2011.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661–9, jun. 1999.

OLIVEIRA FILHO, J.P.; SILVA, D.P.G.; PACHECO, M.D.; MASCARINI, L.M.; RIBEIRO, M.G.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; STIPP, D.T.; BARROS, B.J.P.; BORGES, A.S. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.419-424, 2007.

OLIVEIRA, M. G. et al. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 1-2, p. 139–146, 2008.

PATON, A. W. et al. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6999–7009, nov. 2001.

PITCHER, D. .; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 151–156, 1989.

QUINN, P.J. et al. **Enterobacteriaceae**. In: Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R. (Eds). *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe. 1994.

RIGOBELLO, E.C.; GAMEZ, H.J.; MARIN, J.M.; MACEDO, C.; AMBROSIN, J.A.; ÁVILA, F.A. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária Zootecnia**, v.58, p.305-310, 2006.

SALVADORI, M. R. et al. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiologyn**, v. 34, p. 230–235, 2003.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157 : H7 strain. **Infection and immunity**, v. 63, n. 3, 1995.

SMITH, D. R. Field Disease Diagnostic Investigation of Neonatal Calf Diarrhea. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 3, p. 465–481, 2012.

STATACORP. **Stata Statistical Software: Release 12**. College Station, TX, Stata Corp LP. 2011.

TATARCZAK, M. et al. Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. **Veterinary Microbiology**, v. 110, n. 1-2, p. 77–85, 2005.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207–17, mar. 2010.

TOKUDA, K. et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in kagoshima, Japan: Biofilm formation and acid resistance. **Microbiology and Immunology**, v. 54, n. 6, p. 320–329, 2010.

TOMA, C. et al. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4937–4946, 2004.

UBER, A. P. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, n. 2, p. 251–257, 2006.

VAN BOST, S. et al. Putative roles of the CNF2 and CDTIII toxins in experimental infections with necrotoxicogenic *Escherichia coli* type 2 (NTEC2) strains in calves. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 13, p. 1189–1193, 2003.

VAN BOST, S.; ROELS, S.; MAINIL, J. Necrotoxicogenic *Escherichia coli* type-2 invade and cause diarrhoea during experimental infection in colostrum-restricted newborn calves. **Veterinary Microbiology**, v. 81, n. 4, p. 315–329, 2001.

VEILLEUX, S.; DUBREUIL, J. D. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. **Veterinary Research**, v. 37, p. 3–13, 2006.

YAMAMOTO, T.; NAKAZAWA, M. Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 223–7, jan. 1997.

3. CAPÍTULO 3: DETECÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE FEZES DE BEZERROS BUBALINOS (*BUBALUS BUBALIS*) COM E SEM DIARREIA EM MINAS GERAIS.

3.1. RESUMO

Esse estudo teve como objetivo detectar os fatores de virulência e classificar as amostras em grupos filogenéticos de amostras de *E. coli* isoladas de fezes de bezerros bubalinos. Amostras fecais foram coletadas de 152 bezerros bubalinos com até 90 dias de idade. No total, 217 amostras de *E. coli* foram obtidas após isolamento e identificação e foram testadas por PCR para detecção dos seguintes fatores de virulência: EAST-1, EHEC enterohemolisina, Saa, CNF2, F41, F5, STa, intimina, Stx1 and Stx2. Cento e trinta e quatro isolados de *E. coli* foram positivos para um ou mais fatores de virulência estudados: 84 isolados de fezes de animais diarreicos e 50 de animais sem diarreia. Os patótipos identificados em fezes diarreicas foram ETEC (2/84), NTEC (16/84), STEC (20/84), EPEC (3/84), EHEC (3/84), e EAEC (EAST-1) (33/84). Em fezes não diarreicas foram identificados os patótipos NTEC (21/50), STEC (17/50), EHEC (1/50), e EAEC (EAST-1) (7/50). Fezes de animais com 1 a 30 dias de idade tiveram maior frequência de *E. coli* positivas para os fatores de virulência ($P = 0,094$). Patótipo EAEC (EAST-1) ($P = 0,008$) e filogrupo C ($P = 0,03$) foram associados com a presença de diarreia. A análise dos filogrupos de *E. coli* mostrou que 58.95% pertenciam ao filogrupo B1, seguidos dos filogrupos E (9.70%), B2 (5.9%), C (5.9%), D (5.22%), A (2.24%) e F (1.50%). A Análise de Correspondência mostrou que NTEC ficou perto dos filogrupos B2 e D, e EPEC, EHEC e EAEC (amostras positivas para EAST-1) ficaram perto do filogrupo B1. ETEC ficou perto do filogrupo F. Todos os filogrupos foram identificados em *E. coli* isoladas de fezes com diarreia, sendo os filogrupos A e F os menos frequentes. Em fezes normais, *E. coli* dos filogrupos A e C não foram detectadas. *E. coli* positiva para EAST-1 pode estar associada à presença de diarreia, B1 foi o principal filogrupo de *E. coli* isoladas de bezerros de búfalo, seguido de filogrupo E, e filogrupo C é uma *E. coli* diarreiogênica para bezerros búfalos.

3.2. INTRODUÇÃO

Os bubalinos são ruminantes da família *Bovidae*, subfamília *Bovinae*, tribo *Bovini*, do gênero *Syncerus* (búfalos africanos) ou do gênero *Bubalus* (búfalo doméstico ou búfalos de água) (MATTAPALLIL; ALI, 1999). Os búfalos do gênero *Syncerus* são conhecidos como búfalos africanos, espécie *Syncerus caffer*, são agressivos, não domesticados, presentes principalmente no continente africano. No Brasil os búfalos são criados para a produção de carne, de leite e para tração animal (OLIVEIRA, 2015).

A população de bubalinos no mundo é de cerca de 168 milhões de cabeças e na América a criação do búfalo doméstico, ou búfalo de água, do inglês “water buffalo” (*Bubalus bubalis*) tem aumentado ao longo dos anos (BORGHESE; MAZZI, 2005). O efetivo brasileiro de

bubalinos em 2013 foi de 1,332 milhão de cabeças, representando um aumento de 5,6% no comparativo com 2012. A maior concentração desse plantel ocorre na Região Norte. A Região Sudeste representa 11,3% do efetivo, com Minas Gerais representando 4,3% do efetivo total, com 57.433 cabeças (BRASIL, 2013).

A criação de búfalos na América tem aumentado significativamente. Uma das características que faz o búfalo tão amplamente utilizado na América é a sua capacidade de transformar fibra em energia, com alta capacidade de conversão alimentar. Outras características importantes dos búfalos são a sua rusticidade, capacidade de se adaptar a diferentes climas e baixos custos de produção (BORGHESE; MAZZI, 2005). Em alguns Estados brasileiros, a criação de búfalos tornou-se uma opção econômica, principalmente para produção de leite e, conseqüentemente, para a elaboração do queijo mussarela, originalmente produzido na Itália (BORGHESE; MAZZI, 2005).

A maioria dos búfalos é criada em área tropical, ambiente onde se desenvolvem melhor que os bovinos devida a maior capacidade de aclimação, adaptação em ambientes pantanosos e maior capacidade de digerir forragens com maior teor de fibra. Para que a produção de búfalos nas regiões tropicais seja produtiva é importante disponibilizar condições ambientais adequadas (BASTIANETTO, 2009).

Pelo fato do búfalo ser fenoticamente semelhante aos bovinos, estes animais são manejados de forma semelhante aos bovinos (OLIVEIRA, 2015). Porém, apesar desta semelhança, um estudo demonstrou que a espécie bubalina tem 3% de divergência genética comparada aos bovinos (MOAEEN-UD-DIN; BILAL, 2015). Além disso, um estudo com sequências microssatélite mostrou maior proximidade do *Bubalus bubalis* com *Ovis aries* (ovino) do que com outras espécies domésticas. Apesar dos búfalos compartilharem semelhanças morfológicas e bioquímicas com os bovinos, o estudo sugere que o búfalo de água é mais semelhante aos ovinos que bovinos, compartilhando de uma ascendência comum com ovinos e caprinos após a divergência da subfamília *Bovinae* da família *Bovidae* (MATTAPALLIL; ALI, 1999).

O búfalo é suscetível à maioria das doenças e parasitas que afetam bovinos, embora os efeitos da doença sobre essa espécie e sua produtividade sejam menos evidentes. A maior resistência dos búfalos a algumas doenças permite a redução do uso de medicamentos, possibilitando a produção de leite e carne ausentes de resíduo de medicamentos (BASTIANETTO, 2009).

A diarreia neonatal é um problema significativo em bezerros búfalos. Os principais agentes causadores de diarreias neonatais são *Escherichia coli*, rotavírus, *Salmonella* spp., *Cryptosporidium* spp. A incidência e gravidade da doença dependem de vários fatores como imunidade colostrar, superlotação de animais, idade, qualidade da dieta e cuidados gerais com

os bezerros (FAGIOLO et al., 2005). Patotipos de *E. coli* como *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) estão associados com a etiologia da diarreia em seres humanos e animais (CROXEN; FINLAY, 2010). Bezerros búfalos são suscetíveis aos mesmos patotipos de *E. coli* que causam diarreia em bezerros bovinos, incluindo *E. coli* necrotóxigênica (NTEC) (BORRIELLO et al., 2012).

Existem poucos estudos com patotipos de *E. coli* em bezerros búfalos no mundo (OLIVEIRA et al., 2007; BORRIELLO et al., 2012; MAHANTI et al., 2013; BERALDO et al., 2014). Apesar de se infectarem com os mesmos patotipos encontrados em bovinos, pouco se sabe sobre a epidemiologia da diarreia por *E. coli* patogênica em búfalos. Existem poucos estudos sobre *E. coli* diarreio gênica em bezerros bubalinos e a maioria desses estudos tem como foco de pesquisa STEC, devido sua importância em saúde pública. Estudos filogenéticos de *E. coli* não foram realizados com amostras isoladas de bubalinos.

São necessários estudos sobre de infecções com os principais patotipos de *E. coli* entéricas em bezerros búfalos para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos e para o controle de infecções por *E. coli* patogênicas em fazendas de búfalos (BORRIELLO et al., 2012). Além disso, os ruminantes representam uma importante fonte de contaminação por EHEC na cadeia alimentar (BERTIN et al., 2011). EHEC, especialmente O157: H7 causa colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica em humanos e alimentos de origem animal contaminados são considerados a principal forma de transmissão da EHEC para os seres humanos (DOYLE, 1991) e a contaminação com EHEC e STEC em produtos lácteos originados de búfalas representa um risco potencial para a saúde pública.

Os trabalhos existentes demonstram que ETEC não é comumente encontrada nas fezes de bezerros búfalos, sendo isolada dos animais nos primeiros dias de vida. STEC/EHEC e NTEC parecem ter uma importância maior na etiologia da diarreia em bubalinos jovens, sendo isolada com mais frequência que outros patotipos (FAGIOLO et al., 2005; GALIERO; CARLO; GIORDANELLI, 1999; BORRIELLO et al., 2012).

Pesquisas sobre a diversidade genética de *E. coli* isoladas de bezerros bubalinos ainda não foram realizadas e não se sabe quais filogrupos seriam mais importantes nessa espécie. Pouco se sabe sobre a importância de determinados fatores de virulência e patotipos de *E. coli* diarreio gênicas para bubalinos jovens, e menos ainda se conhece sobre a frequência de grupos filogenéticos nessa espécie e entre os diversos patotipos, e sua importância na etiologia da diarreia. É fundamental caracterizar isolados de *E. coli* obtidos de bezerros bubalinos com e sem diarreia para determinar fatores de virulência que possam estar envolvidos na patogênese ou não da diarreia, além de caracterizar faixas etárias mais suscetíveis.

A identificação e combinações de alguns genes podem ser usadas para caracterizar amostras de *E. coli* em grupos filogenéticos. Os estudos filogenéticos iniciais utilizando análise MLEE (*multi-locus enzyme electrophoresis*) definiram seis grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D e E). Análises subsequentes identificaram quatro grupos principais (A, B1, B2 e D) e dois grupos acessórios C e E (TENAILLON et al., 2010; CHAUDHURI; HENDERSON, 2012). Análises utilizando MLST (*multi-locus sequence typing*) permitiram o conhecimento dos grupos filogenéticos e a identificação de sete filogrupos de *E. coli* A, B1, B2, C, D, E e F (CLERMONT et al., 2013). MLST é a melhor técnica de filotipagem de *E. coli*, mas o tipo de sequência (*sequence typing* - ST) fornecida na análise não permite a classificação em filogrupo e é necessário determinar a correspondência entre ST e filogrupo, esta última realizada por meio do "método de Clermont" (CLERMONT et al., 2013; CLERMONT; GORDON; DENAMUR, 2015).

Estudos utilizando a tipagem filogenética mostraram que as amostras de *E. coli* pertencentes às diferentes filogrupos não são encontradas de forma aleatória nos hospedeiros, podendo estar associados com o hospedeiro e doença (CLERMONT et al., 2013). Desde a sua introdução em 2000 (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000), a tipagem filogenética usando a PCR se tornou amplamente utilizada devido à sua simplicidade e rapidez. O método foi melhorado em 2013 (CLERMONT et al., 2013), e por meio de uma PCR *quadruplex*, pode-se identificar os sete filogrupos. A tipagem filogenética utilizando PCR tem 80-95% de correspondência com a análise de MLST, indicando que o teste pode ser utilizado para estudar a diversidade filogenética de amostras de *E. coli* (GORDON et al., 2008; CLERMONT et al., 2013).

Estudos filogenéticos são importantes para o entendimento da relação entre comensalismo e patogenicidade de *E. coli* e da relação com os hospedeiros e suas doenças relacionadas (TENAILLON et al., 2010). Devido à falta de informação sobre *E. coli* patogênica isolada de bezerros bubalinos, este estudo teve como objetivo (i) determinar os fatores de virulência, (ii) os grupos filogenéticos e (iii) as relações entre os patótipos e os grupos filogenéticos de *E. coli* isoladas de fezes de bezerros bubalinos com e sem diarreia e até 90 dias de idade, em Minas Gerais, Brasil.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. AMOSTRAS

Amostras de fezes de bezerros bubalinos foram coletadas de cinco fazendas localizadas em Minas Gerais, duas em Carmo da Mata e três em Oliveira. Todas as fazendas criavam apenas bubalinos das raças Mediterrâneo e/ou Murrah para a produção de leite.

Amostras fecais de 152 bezerros bubalinos com até 90 dias de idade foram coletadas em 2013. Os animais foram selecionados aleatoriamente e cada bezerro foi amostrado uma vez durante a visita à fazenda. Os animais foram classificados em três grupos de acordo com sua idade, 1-30 dias de idade, 31-60 dias de idade e 61-90 dias de idade. As fezes foram classificadas como diarreica se apresentavam uma consistência aquosa a pastosa e como normal se apresentavam consistência firme, e o períneo e a cauda dos animais estavam limpos.

As visitas às fazendas foram feitas uma vez limitando o número de bezerros amostrados em cada categoria de idade e apresentação clínica. No momento da amostragem, 107 animais foram considerados diarreicos, 64 com 1-30 dias de idade, 34 com 31-60 dias de idade, e 9 com 61-90 dias de idade. Quarenta e cinco animais não apresentavam diarreia, 10 com 1-30 dias de idade, 26 com 31-60 dias de idade e 9 com 61-90 dias de idade. As amostras foram coletadas diretamente da ampola retal em sacos plásticos e armazenadas a 4°C até exame bacteriológico.

3.3.2. EXAME BACTERIOLÓGICO

Um grama de fezes foi diluído em 3 mL de PBS (NaCl 0,015 M, 0,01 M PO₄, pH 7,2) e 1 mL desta diluição foi inoculada em 9 mL de água peptona tamponada (Difco Laboratories, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA) e incubada por 18-24h a 37 °C. Após a incubação, 10 µL das culturas foram então plaqueadas em placas de ágar de MacConkey (Difco Laboratories, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA) e incubadas a 37 °C por 18-24h. Até três colônias lactose positivas de cada placa foram identificadas bioquimicamente (QUINN et al., 1994). As amostras de *E. coli* foram armazenadas à temperatura ambiente em meio de manutenção por um período máximo de dois meses antes de análises moleculares.

3.3.3. EXTRAÇÃO DE DNA E IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA POR PCR

Os isolados de *E. coli* armazenados em meio de manutenção foram plaqueados em ágar MacConkey e incubados por 18-24 h a 37°C. Em seguida, a massa bacteriana foi suspensa em 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl; EDTA 1 mM, pH 8,0) em microtubos de 1,5 mL e o DNA foi extraído de acordo com Pitcher et al. (1989).

A PCR foi realizada para determinar a presença dos seguintes fatores de virulência: EAST-1 (YAMAMOTO; NAKAZAWA, 1997), EHEC hemolisina (SCHMIDT; BEUTIN; KARCH, 1995), Saa (JENKINS et al., 2003), CNF2 (BLANCO et al., 1996), e F41, F5, STa, *eae*, Stx1, Stx2 (multiplex PCR) (FRANCK; BOSWORTH; MOON, 1998). Amostras de referência de *E. coli* foram utilizadas como controles positivos: B41 (O101: H-: F41+, F5+, STa+), EDL 933 (O157: H7; Stx1+, Stx2+, *eae*+, hlyA⁺), EAEC O42 (EAST-1+), S5 (CNF2+) e STECLBA05 (Saa+). Água ultrapura foi utilizada como controle negativo.

3.3.4. DETERMINAÇÃO DOS FILOGRUPOS DE *E. COLI*

As amostras de *E. coli* positivas para um ou mais fatores de virulência foram avaliadas para *chuA*, *yjaA*, TSPE4.C2, *arpA*, *trpA* por meio de uma PCR para a caracterização dos filogrupos A, B1, B2, C, D, E e F de acordo com a Clermont et al. (2013). Se um grupo filogenético não foi identificado, as amostras de *E. coli* foram testadas para o gene *uidA* para confirmar a detecção de *E. coli* (MCDANIELS et al., 1996), tal como sugerido por Clermont et al. (2013).

3.3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises de dados foram realizadas utilizando o software estatístico Stata®/SE 12.0 (STATA CORP, 2011). Foram estudadas associações entre a ocorrência de diarreia e idade dos animais, patótipos e filogrupos de *E. coli* utilizando o teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher. O resultado foi considerado como sendo significativo se $P \leq 0,05$.

Análise de correspondência (GREENACRE; BLASIUS, 2006) foi usada para estudar as variáveis categóricas patótipos e filogrupos de *E. coli*. Na análise de correspondência, a relação entre as variáveis categóricas foi representada em um gráfico bidimensional, com o valor da terceira dimensão entre parênteses. A análise de correspondência consiste em uma técnica exploratória multivariada, que examina associação entre as categorias estudadas a partir de uma tabela de contingência. O resultado da associação entre os patótipos e filogrupos de *E. coli* é determinado após a visualização no gráfico de quais variáveis foram agrupadas ou ficaram mais próximas (HAIR et al., 2010).

3.3.6. PROTOCOLO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Esse estudo foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (CEUA/UFMG, número de protocolo 133/2012).

3.4. RESULTADOS

No total, 217 amostras de *E. coli* foram isoladas a partir de 152 amostras fecais e analisadas por meio de uma PCR. Cento e trinta e quatro isolados (61,75%) foram positivos para um ou mais fator de virulência: 84 (62,68%) obtidos de fezes diarreicas e 50 (37,32%) de fezes normais.

Foi realizada a classificação dos patótipos de *E. coli* a partir da combinação dos fatores de virulência (Figura 3.1). Amostras de *E. coli* com combinação atípica de fatores de virulência que não permita a classificação em patótipo foram classificadas como "outros". EAST-1 foi

identificada como único fator de virulência em amostras de *E. coli* sendo, então, classificada como patotipo EAEC.

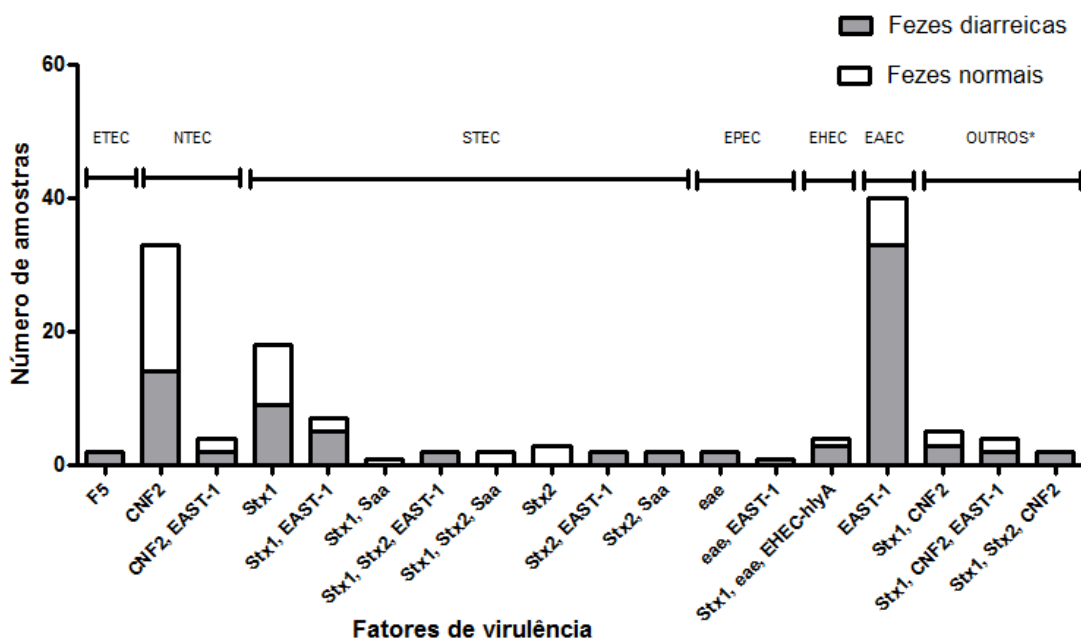


Figura 3.1: Número de amostras, fatores de virulência e patotipos de *Escherichia coli* isoladas de amostras fecais diarreicas e não diarreicas de bezerros bubalinos com até 90 dias de idade em Minas Gerais. * Amostras de *E. coli* com fatores de virulência que não permitem a classificação em patotipo foram classificadas como "outros"

Os patotipos de *E. coli* identificados nas fezes normais e fezes diarreicas de acordo com cada grupo de idade estão na Figura 3.2. A maior frequência de bezerros com diarreia e o maior número de amostras de *E. coli* positivas para os fatores de virulência estudados (48,50%) foram detectados em bezerros com idade entre 1 a 30 dias de idade (Figura 3.2), mas não houve diferença estatística significativa ($P = 0,094$). Patotipo EAEC foi associado com a presença de diarreia ($P = 0,008$).

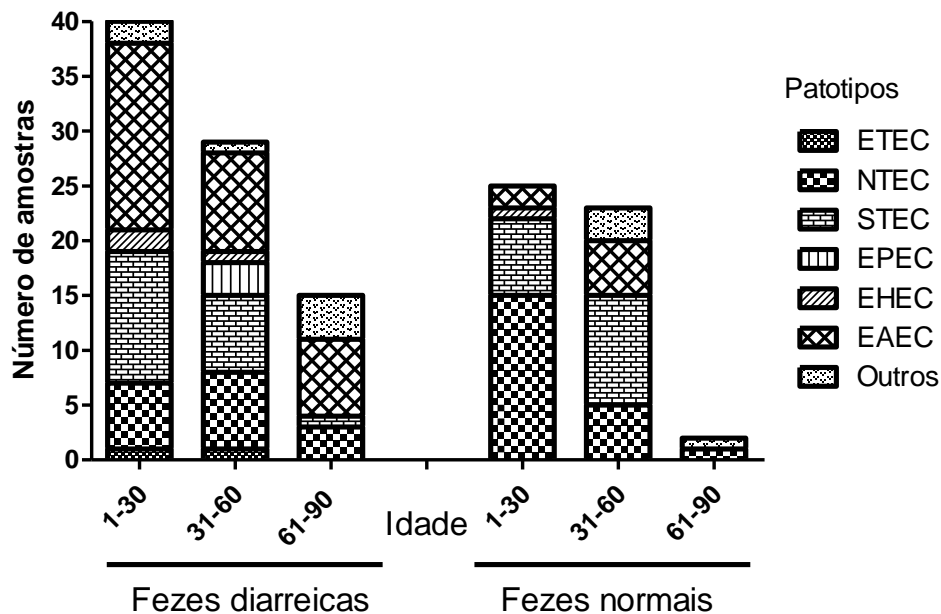


Figura 3.2: Número de amostras de acordo com patótipo de *E. coli* identificado em amostras fecais diarreicas e não diarreicas nos três grupos de idade dos bezerros bubalinos.

A análise dos grupos filogenético das 134 amostras de *E. coli* isoladas das fezes dos bezerros bubalinos mostrou que 58,95% dos isolados pertencem ao filogrupo B1, seguido dos filogrupos E (9,70%), B2 (5,9%), C (5,9%), D (5,22%), A (2,24%) e F (1,50%). Quatorze amostras de *E. coli* foram designadas como filogrupo "desconhecido" porque foram positivas para *arpA/chuA/yjaA/TspE4.C2*, e foram testados para o gene *uidA*, confirmando a detecção genética de *E. coli* (Tabela 3.1). Todos os sete grupos filogenéticos foram detectados em *E. coli* isoladas de fezes diarreicas mas a frequência dos grupos filogenéticos A e F foi baixa em relação aos outros filogrupos. Em amostras de *E. coli* de fezes normais, filogrupos A e C não foram encontrados. O filogrupo C foi associada à presença de diarreia ($P = 0,03$).

Tabela 3.1: Identificação dos filogrupos de *E. coli* isoladas de fezes diarreicas e normais de bezerros bubalinos em Minas Gerais, Brasil.

Característica das fezes	Filogrupo							
	A	B1	B2	C	D	E	F	Desconhecido
Diarreica	3	50	2	8	4	6	1	10
Normal	0	29	6	0	3	7	1	4
Total	3	79	8	8	7	13	2	14

Os grupos filogenéticos de *E. coli* identificados nos diferentes patótipos foram: filogrupos E (1/2) e F (1/2) em ETEC; filogrupos B1 (23/37), B2 (6/37), D (3/37) e E (4/37) em NTEC; filogrupos B1 (14/37), B2 (2/37), C (2/37), D (3/37), E (5/37) e F (1/37) em STEC; filogrupo B1 em todas as EPEC; filogrupo B1 (3/4) em EHEC; filogrupos A (3/40), B1 (30/40), C (4/40), D (1/40) e E (2/40) em EAEC. Amostras classificadas como filogrupo "desconhecido" foram identificados em NTEC (1/37), STEC (10/37), EHEC (1/4) e Outros (2/11)

A análise de correspondência foi realizada utilizando os patótipos e os grupos filogenéticos para verificar a associação entre essas variáveis. A representação das duas dimensões e o valor da terceira estão representadas na Figura 3.3. Esta representação bidimensional explica 94,55% da variação total, com 47,68% explicado pela primeira dimensão, 26,63% pela segunda dimensão e 20,63% pela terceira. NTEC ficou perto dos filogrupos B2 e D. EPEC, EHEC e EAEC (amostras positivas para EAST-1) ficaram perto do filogrupo B1. ETEC ficou perto do filogrupo F. STEC ficou relativamente perto de E e B1.

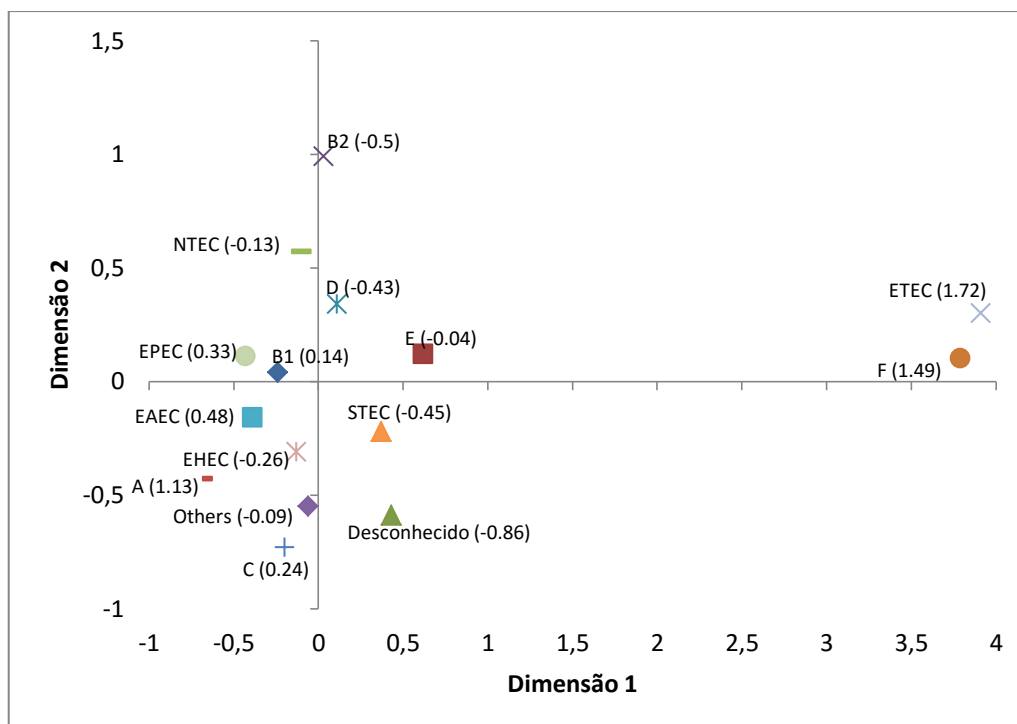


Figura 3.3: Análise de Correspondência para as categorias analisadas. Patótipo e filogrupo relacionados são plotados perto no gráfico. A representação bidimensional explica 94,55% da variação total, com 47,68% explicada pela primeira dimensão, 26,63% pela dimensão segunda e 20,63% pela terceira. O valor da terceira dimensão é mostrado entre parênteses.

3.5. DISCUSSÃO

O búfalo doméstico é suscetível a maioria das doenças e parasitas que acometem os bovinos e as maiores perdas na produção de bubalinos se concentram na fase de bezerros (FAGIOLLO et al., 2005). A diarreia é a síndrome mais comum de bezerros bovinos até 30 dias de idade, ocorrendo, principalmente, nas duas primeiras semanas de idade (BARTELS et al., 2010; COURA et al., 2015). No presente estudo, no momento da amostragem, 70% dos bezerros bubalinos tinham diarreia, principalmente bezerros com 1-30 dias de idade. Além disso, a maioria dos fatores de virulência de *E. coli* patogênica foi detectada em amostras isoladas de animais com diarreia e com idades entre 1 a 30 dias de idade. Estes resultados indicam que a diarreia em bezerros de búfalo dentro do primeiro mês de idade é uma síndrome clínica importante e que o envolvimento de *E. coli* diarreio gênica deve ser estudada.

ETEC foi identificada em amostras de fezes diarreicas, mas em baixa frequência, indicando que esse patótipo parece não ser tão importante para bezerros bubalinos como é para bovinos, uma vez que para bezerros bovinos de corte e de leite ETEC é uma causa comum de diarreia, principalmente nos primeiros quatro dias de vida (DEBROY; MADDOX, 2001;

KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015). Estudos com bubalinos indicam uma baixa ocorrência de ETEC (GALIERO; CARLO; GIORDANELLI, 1999; BORRIELLO et al., 2012) entre *E. coli* isoladas a partir desses animais. Além disso, Borriello et al. (2012) não encontram amostras positivas para ST, somente para LT.

EAST-1 foi identificada em alta frequência e associada com a presença de diarreia, indicando que amostras de *E. coli* positivas para a toxina podem desempenhar um papel na patogênese da diarreia nos bezerros bubalinos. A toxina EAST-1 foi detectada primeiramente em amostras de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), podendo também ocorrer em outros patótipos de *E. coli*, como ETEC, EPEC e EHEC (NAGY; FEKETE, 2005). EAST-1 já foi identificado em *E. coli* isoladas de suínos, bovinos e seres humanos com diarreia (VEILLEUX; DUBREUIL, 2006), mas o seu papel na patogênese da diarreia em não é clara (KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015). Este é o primeiro estudo a avaliar a presença do gene da toxina em amostras de búfalos, e os resultados demonstram que EAST-1 deve ser considerado como um determinante adicional na patogênese da diarreia em búfalos.

A baixa frequência de EPEC em nosso estudo está de acordo com outros estudos com búfalos no Brasil (BERALDO et al., 2014), Índia (MAHANTI et al., 2013) e Vietnã Central (VU-KHAC; CORNICK, 2008). EPEC também é detectada em baixa frequência em amostras de *E. coli* isoladas das fezes de bezerros bovinos no Brasil (ANDRADE et al., 2012; COURA et al., 2015), na Turquia (GÜLER; GÜNDÜZ; OK, 2008) e no Vietnã (NGUYEN; VO; VU-KHAC, 2011). Embora os estudos tenham ocorrido em regiões geográficas diferentes, os resultados indicam que a ocorrência de EPEC é baixa nos bezerros bubalinos e bovinos.

Em nosso estudo, a frequência de STEC foi de 26,12%. Outros estudos apresentaram resultados semelhantes (BERALDO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2007). Galiero et al. (1999) mostrou que 6,5% das amostras de *E. coli* isoladas de bezerros bubalinos com doenças entéricas e sistêmicas produziam toxina Shiga. Borriello et al. (2012) investigaram a presença de *E. coli* patogênicas em bezerros bubalinos com menos de 4 semanas de idade e com diarreia e STEC foi detectada em 6,8% das amostras. A variação na frequência de *E. coli* pode ocorrer devido ao número de animais estudados, a idade dos animais e região, mas coletivamente, os resultados demonstram que STEC é um importante agente patogênico para bezerros bubalinos. Além disso, os ruminantes são importantes reservatórios de STEC/EHEC para seres humanos e a presença desses patógenos nas fezes de búfalos pode representar um risco potencial para a saúde humana, especialmente através do consumo de leite cru de vaca búfala.

Saa foi detectada em amostras de STEC, resultados que está de acordo com Oliveira et al. (2007). Paton et al. (2001) descreveram pela primeira vez o gene para Saa em amostras de STEC LEE-negativas e Jenkins et al. (2003) sugerem que Saa pode ter um papel na adesão ao epitélio intestinal de bovino. Enterohemolisina (*ehxA*) não foi detectada em associação com Saa, mas em vez disso foi encontrado em amostras *eae* e *stx* positivas. Resultados semelhantes foram

encontrados por Borrielo et al. (2012) e Beraldo et al. (2014). Porém, Vu-Khac e Cornick (2008) e Oliveira et al. (2007) detectaram em STEC isoladas de búfalos positivas para Stx em associação com enterohemolisina e Saa. Enterohemolisina é produzida por vários tipos patogênicos de *E. coli* que causam infecções intestinais, especialmente em amostras de NTEC, ETEC e STEC. Trabalhos demonstram uma associação da produção de toxinas Shiga e enterohemolisina, indicando um possível papel de hemolisinas na virulência bacteriana (SCHMIDT; BEUTIN; KARCH, 1995; MAINIL, 2013). Nossos resultados indicam que amostras de STEC isoladas a partir de fezes de bezerros bubalinos são positivas para Saa, enquanto amostras de EHEC possuem o gene enterohemolisina juntamente com genes para Stx e eae.

Foram realizados poucos estudos sobre amostras de NTEC isoladas de bezerros bubalinos. No presente estudo, NTEC foi detectado em uma alta frequência, tanto em animais diarreicos e como não diarreicos. Outros estudos também encontraram uma elevada frequência de NTEC (GALIERO; CARLO; GIORDANELLI, 1999; BORRIELLO et al., 2012) em relação a outros patótipos, demonstrando que NTEC é um patótipo de *E. coli* que pode causar diarreia em búfalos jovens.

Este é o primeiro estudo que caracteriza os sete grupos filogenéticos de *E. coli* isoladas a partir das fezes de bezerros bubalinos. Nossos resultados demonstram que os sete filogrupos de *E. coli* estão presentes em amostras isoladas de bubalinos, sendo o filogrupo B1 o mais comum, seguido de E. O filogrupo C está associado à presença de diarreia. Esses resultados estão de acordo com outros que demonstram uma elevada frequência de B1 de amostras de *E. coli* de herbívoros (HIGGINS et al., 2007; BALDY-CHUDZIK; MACKIEWICZ; STOSIK, 2008; TENAILLON et al., 2010). Clermont et al. (2011) mostraram que as infecções intestinais são causadas principalmente por A/B1/E e que o filogrupo C pode estar associado a infecções intestinais e extraintestinais.

A pesquisa dos grupos filogenéticos de *E. coli* permitem entender a relação entre a bactéria, os hospedeiros e doenças causadas (TENAILLON et al., 2010). As análises de correspondência indicam que NTEC são principalmente filogrupo B2 e, em menor medida, filogrupo D. NTEC pode causar diarreia e septicemia em bezerros recém-nascidos que não receberam colostro (VAN BOST; ROELS; MAINIL, 2001) e sua importância na etiologia da diarreia em bezerros tem aumento ao longo dos anos (KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015). Amostras de *E. coli* extraintestinais estão agrupadas principalmente nos filogrupos B2 e D (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004). *E. coli* isoladas de pacientes humanos com septicemia pertencem principalmente aos filogrupos B2 e D (ČUROVÁ et al., 2014). Nossos resultados sugerem que NTEC de bezerros bubalinos possuem características de amostras de *E. coli* extraintestinais.

EPEC, EHEC e EAEC isoladas de bezerros bubalinos são principalmente do filogrupo B1. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em outros estudos com diferentes espécies (BALDY-CHUDZIK; MACKIEWICZ; STOSIK, 2008; TRAMUTA; ROBINO; NEBBIA, 2008; CHAUDHURI; HENDERSON, 2012). ETEC é especialmente do filogrupo F. Nenhum agrupamento filogenético particular de ETEC foi identificado (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004). Nossos resultados de ETEC são de difícil comparação, uma vez que foram detectados apenas dois isolados e ambos foram negativos para a toxina STa.

A detecção de amostras *E. coli* com filogrupo "desconhecido" não é um resultado inesperado, uma vez que outros estudos de *E. coli* isoladas de búfalos não foram realizados. De acordo com Clermont et al. (2013), amostras de *E. coli* que não podem ser atribuídas a um filogrupo pode ocorrer devido à rara frequência do filogrupo, recombinação de dois diferentes filogrupos ou genoma altamente variável de *E. coli* impulsionado por ganho e perda de genes.

Os resultados deste estudo mostram que a diarreia é uma importante síndrome em bubalinos jovens, principalmente no primeiro mês de vida. Os patótipos EAEC e, em menor grau, NTEC e STEC, parecem ser importantes agentes de diarreia. Ao contrário, os patótipos ETEC, EHEC e EPEC não são tão importantes. O Filogrupo B1 predomina em *E. coli* patogênicas isoladas de fezes de bezerros bubalinos e o filogrupo C pode estar associado a uma maior ocorrência de diarreia. A identificação de fatores de virulência e a análise filogenética são ferramentas de epidemiologia molecular úteis no estudo de *E. coli* patogênica e fornecem conhecimento para o entendimento da patogenidade e comensalismo de amostras de *E. coli*.

3.6. REFERÊNCIAS

ANDRADE, G. I. 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, n. 7, p. 1783–90, out. 2012.

BALDY-CHUDZIK, K.; MACKIEWICZ, P.; STOSIK, M. Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 1-2, p. 173–184, 2008.

BARTELS, C. J. M. et al. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, n. 2-3, p. 162–9, 1 fev. 2010.

BASTIANETTO, E. Criação de búfalos no Brasil : situação e perspectiva. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 98–103, 2009.

BERALDO, L. G. et al. Detection of Shiga toxigenic (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in dairy buffalo. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1-2, p. 162–166, 2014.

BERTIN, Y. et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* gains a competitive advantage by using ethanolamine as a nitrogen source in the bovine intestinal content. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 365–377, 2011.

BLANCO, M. et al. Polymerase chain reaction for detection *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, p. 95–101, 1996.

BORGHESE, A.; MAZZI, M. **Buffalo population and strategies in the world**. In: Borghese, A. (Ed.), *Buffalo Production and Research*. Rome: FAO Regional Office for Europe Inter-Regional Cooperative Research Network on Buffalo. p. 1–40, 2005.

BORRIELLO, G. et al. Characterization of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and necrotoxigenic *E. coli* (NTEC) isolated from diarrhoeic Mediterranean water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 18–22, ago. 2012.

BRASIL. Produção da Pecuária Municipal. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. v.41, 2013.

CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 214–26, mar. 2012.

CLERMONT, O. et al. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 654–62, abr. 2011.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, fev. 2013.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–8, out. 2000.

CLERMONT, O.; GORDON, D.; DENAMUR, E. A guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology**, p. 0–20, 2015.

COURA, F. M. et al. Longitudinal study of Salmonella spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 3–11, 2015.

CROXEN, M. A; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26–38, jan. 2010.

ČUROVÁ, K. et al. Toxins of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolated from Blood Culture. **Clinical Microbiology**, v. 03, n. 05, p. 5–8, 2014.

DEBROY, C.; MADDOX, C. W. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. **Animal Health Research Reviews**, v. 2, n. 2, p. 129–40, dez. 2001.

DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 289–301, 1991.

ESCOBAR-PÁRAMO, P. et al. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 6, p. 1085–1094, 2004.

FAGIOLO, A. et al. **Buffalo Pathologies**. In: pp. In: Borghese, A. (Ed.), *Buffalo Production and Research*. Rome: FAO Regional Office for Europe Inter-Regional Cooperative Research Network on Buffalo, p. 249–296, 2005.

FRANCK, S. M.; BOSWORTH, B. T.; MOON, H. W. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1795–7, 1998.

GALIERO, G. et al. Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. **The Veterinary Record**, v. 156, n. 12, p. 382–3, 2005.

GALIERO, G.; CARLO, E. DE; GIORDANELLI, M. P. Detection of verocytotoxin, thermolabile enterotoxin, thermostable enterotoxin, cytotoxic necrotizing factor and haemolysin

producing strains of *E. coli* isolated from buffalo calves. **Bubalus Bubalis**, v. 5, n. 4, p. 75–78, 1999.

GORDON, D. M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2484–96, out. 2008.

GREENACRE, M.; BLASIUS, J. **Multiple Correspondence Analysis and Related Methods**. Florida: Chapman-Hall. 2006.

GÜLER, L.; GÜNDÜZ, K.; OK, U. Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 5, p. 249–257, 2008.

HAIR, J. F. et al. **Multivariate Data Analysis**. New Jersey: Prentice Hall. 2010.

HIGGINS, J. et al. Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, n. 2, p. 227–35, ago. 2007.

JENKINS, C. et al. Distribution of the saa gene in strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1775–8, abr. 2003.

KOLENDA, R.; BURDUKIEWICZ, M.; SCHIERACK, P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. March, 2015.

MAHANTI, A et al. Isolation, molecular characterization and antibiotic resistance of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from buffalo in India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 291–8, abr. 2013.

MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1-2, p. 2–12, 15 mar. 2013.

MATTAPALLIL, M.; ALI, S. Analysis of conserved microsatellite sequences suggests closer relationship between Water Buffalo *Bubalus bubalis* and sheep *Ovis aries*. **DNA and cell Biology**, v. 18, n. 6, p. 513-519, 1999

MCDANIELS, A. E. et al. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and β -D-glucuronidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3350–3354, 1996.

MOAEEN-UD-DIN, M.; BILAL, G. Sequence diversity and molecular evolutionary rates between buffalo and cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 132, n. 1, p. 74–84, 2015.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 443–54, out. 2005.

NGUYEN, T. D.; VO, T. T.; VU-KHAC, H. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. **Journal of Veterinary Science**, v. 12, n. 2, p. 159–164, 2011.

OLIVEIRA, M. G. et al. Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as an important reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 18, p. 5945–8, set. 2007.

OLIVEIRA, C. H. S. **Linfoma multicêntrico em búfalos no Brasil: etiologia, patologia e clínica**. 2015. 66f. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

PATON, A. W. et al. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6999–7009, nov. 2001.

PITCHER, D. .; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 151–156, 1989.

QUINN, P.J. et al. **Enterobacteriaceae**. In: Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R. (Eds). *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe. 1994

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157 : H7 strain. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 3, 1995.

STATA CORP. **Stata Statistical Software: Release 12**. College Station, TX. StataCorp LP. 2011.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207–17, mar. 2010.

TRAMUTA, C.; ROBINO, P.; NEBBIA, P. Phylogenetic background of attaching and effacing *Escherichia coli* isolates from animals. **Veterinary Research Communications**, v. 32, n. 6, p. 433–437, 2008.

VAN BOST, S.; ROELS, S.; MAINIL, J. Necrotoxicogenic *Escherichia coli* type-2 invade and cause diarrhoea during experimental infection in colostrum-restricted newborn calves. **Veterinary Microbiology**, v. 81, n. 4, p. 315–329, 2001.

VEILLEUX, S.; DUBREUIL, J. D. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. **Veterinary Research**, v. 37, p. 3–13, 2006.

VU-KHAC, H.; CORNICK, N. A. Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 356–63, 25 jan. 2008.

YAMAMOTO, T.; NAKAZAWA, M. Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 223–7, jan. 1997.

4. CAPÍTULO 4: DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE AVES SEM ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS E CONDENADAS POR SUSPEITA DE COLIBACILOSE.

4.1. RESUMO

E. coli patogênica aviária (APEC) está associada a infecções extraintestinais e colisepticemia em aves, resultando em perdas econômicas para a indústria avícola. O objetivo do estudo foi determinar os grupos filogenéticos de amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frangos com aparência normal liberadas para consumo e carcaças condenadas por colibacilose em um matadouro com Serviço de Inspeção Federal no estado de Tocantins. As amostras foram coletadas de trato respiratório (traqueia e nos sacos aéreos), fígado e coração de carcaças sem lesões macroscópicas (liberadas para consumo). Amostras de trato respiratório, fígado e coração de carcaças condenadas por suspeita de colibacilose também foram coletadas. Cento e trinta e sete amostras de *E. coli* foram obtidas após isolamento e identificação bioquímica. Oitenta e quatro amostras de *E. coli* foram isoladas de carcaças de frangos de corte condenados, dos quais 11 foram isoladas do coração, 7 do fígado e 66 do trato respiratório. Das 53 amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frangos sem alterações macroscópicas, 5 foram isoladas de coração, 4 de fígado e 44 de trato respiratório. Nossos resultados demonstram que os filogrupos A seguido por B1 são os filogrupos mais comuns de *E. coli* isoladas de carcaças de frangos saudáveis, enquanto os filogrupos B1 seguido por A são os mais comuns em carcaças de frangos condenadas. Além disso, os filogrupos B2, C, D, E e F são os menos comuns e os filogrupos B2 e D podem ser consideradas de *E. coli* patogênica extraintestinal para aves.

4.2. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador e o terceiro maior produtor de carne de frango. Em 2013, foram alojadas 46.142.775 milhões de matrizes de corte e a produção brasileira de carne de frango em 2013 foi de 12,3 milhões de toneladas (UBABEF, 2014). De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em 2013 4.001.855 de aves foram diagnosticadas com colibacilose, das quais 2.753.920 aves foram condenadas (parcialmente e/ou totalmente) (BRASIL, 2014).

As aves destinadas ao consumo são julgadas conforme a Portaria 210 de 26 de novembro de 1998 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1998). A inspeção *post-mortem* das aves, executada na seção de evisceração, é realizada individualmente durante o abate por uma pessoa treinada designada para tal função através do exame visual macroscópico das carcaças e vísceras e, conforme o caso, palpação e cortes, ressaltando que o juízo final sobre a comestibilidade das carnes e vísceras, cabe única e exclusivamente ao veterinário oficial (BRASIL, 1998). De acordo com esta legislação, qualquer órgão ou outra parte da carcaça que estiver afetada por um processo inflamatório de caráter sistêmico, como

colibacilose e aerossaculite, deverá ser condenada em sua totalidade, carcaças e as vísceras (BRASIL, 1998).

A colibacilose aviária é uma doença das aves causada por *Escherichia coli* e considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade de aves (KABIR, 2010). Resulta em perdas econômicas, menor ganho de peso e aumento das condenações de carcaças no abatedouro. A infecção se inicia no trato respiratório, resultando em septicemia, aerossaculite e, subsequentemente, perihepatite e pericardite (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

E. coli são bactérias Gram-negativa, fermentativas, anaeróbias facultativas, cultivadas facilmente em meios de cultura de rotina, e presentes no trato intestinal da maioria dos animais (GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Apesar de serem comensais, algumas estirpes possuem fatores de virulência específicos podendo causar infecções em aves, sendo denominadas de *E. coli* aviária patogênica (APEC) (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). APEC possui diferentes fatores de virulência. Os fatores de virulência descritos incluem adesinas, toxinas, sistemas de captação de ferro e resistência ao soro do hospedeiro, porém ainda não existe uma definição clara em patotipos para amostras de APEC (NAKAZATO et al., 2009)

A infecção ocorre principalmente via inalação de poeira contaminada com fezes. A colibacilose é principalmente secundária a infecções respiratórias por outros agentes como vírus de Newcastle, vírus da bronquite infecciosa e *Mycoplasma gallisepticum* (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Essas infecções primárias resultam em maior suscetibilidade a *E. coli*, pois resultam em destruição do epitélio ciliar do trato respiratório, aumentando a exposição à amônia e poeira contaminada (NAKAZATO et al., 2009).

Diferentes manifestações clínicas são observadas, como infecção do trato respiratório, síndrome da cabeça inchada, salpingite, septicemia, celulites, entre outros. A colibacilose na sua forma aguda é caracterizada por septicemia, resultando em morte e em sua forma subaguda por aerossaculite, perihepatite e pericardite (KABIR, 2010). A prevenção da colibacilose envolve a diminuição da contaminação ambiental, controle de outras doenças primárias, e medidas de manejo (controle da humidade, ventilação e concentração de amônia) (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

Além da identificação dos fatores de virulência, é possível realizar a tipagem filogenética das amostras de *E. coli* em um dos sete filogrupos. Os estudos de tipagem filogenética mostraram que as amostras de *E. coli* pertencentes aos diferentes filogrupos podem estar associados com a fonte de isolamento (CLERMONT et al., 2013). Os filogrupos A e B2 são os mais comuns em *E. coli* isoladas de seres humanos, sendo o B1 e D os menos prevalentes. Nos animais, os filogrupos B1 são as mais prevalentes, seguidos de B2 e D (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012). Porém, pouco se sabe sobre a relação entre os grupos

filogenéticos e a especificidade de hospedeiros, e se esta variação na prevalência de grupos filogenéticos entre diferentes hospedeiros é devida à existência de amostras específicas a determinados hospedeiros (TENAILLON et al., 2010).

Os estudos sobre os grupos filogenéticos de *E. coli* demonstraram que diferentes filogrupos podem estar relacionados também a diferentes síndromes clínicas. Por exemplo, amostras de *E. coli* responsáveis por infecções extraintestinais pertencem mais aos filogrupos B2 e D do que A ou B1. Utilizando uma PCR, com base na presença/ausência dos fragmentos de determinados genes, uma cepa de *E. coli* poderia ser atribuída a um dos sete principais filogrupos, A, B1, B2, C, D, E e F e forneceria evidência adicional de que as amostras diferem em suas características genotípicas, seu nicho ecológico e capacidade de causar doenças (CLERMONT et al., 2013).

Devido à importância das infecções por *E. coli* em aves e seu impacto econômico, o presente estudo teve como objetivo determinar os grupos filogenéticos de *E. coli* isoladas de carcaças de frangos de corte sem alterações macroscópicas liberadas para consumo e carcaças condenadas por colibacilose.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1. COLETA DE AMOSTRAS E ANÁLISE BACTERIANA

As amostras de carcaças de frango foram coletadas no período de maio de 2011 a abril de 2012, em um abatedouro com serviço de inspeção federal (SIF) do Estado do Tocantins composto por lotes provenientes de São Paulo, Goiás, Tocantins e Distrito Federal. Foram coletadas amostras de trato respiratório (traqueia, sacos aéreos, fenda palatina), fígado e coração de carcaças sem lesões macroscópicas (que não foram condenadas). Amostras de traqueia, sacos aéreos, fígado e coração de carcaças condenadas por suspeita de colibacilose também foram coletados.

Utilizou-se *swabs* para coletar as amostras das carcaças. Após a coleta, a amostra coletada por *swabs* foram transferidos para um tubo de ensaio esterilizado contendo 0,9 mL de solução salina a 0,85% e armazenados em -20 °C no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da EMVZ/UFT até o processamento laboratorial. O processamento laboratorial das amostras foi realizado na mesma semana da coleta.

Para o isolamento e identificação *E.coli* as amostras armazenadas a -20°C foram descongeladas para processamento, de acordo com Brenner (1984). Os *swabs* foram repicados em Ágar McConkey e incubados a 37 °C por 24 h. Após verificação do crescimento, colônias lactose positivas e negativas foram transferidas para ágar tríplice açúcar e ferro (TAF), e novamente incubados a 37 °C por 24 h. Para confirmar se os isolados eram de fato *E. coli*,

foram feitas as provas bioquímicas de indol e vermelho de metila, motilidade, produção de H₂S, urease, reação no citrato de Simmons, glicose, lactose e sacarose.

4.3.2. EXTRAÇÃO DE DNA E DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO

As amostras de *E. coli* identificadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da EMVZ/UFT foram enviadas em ágar Nutriente à temperatura ambiente ao Laboratório de Bacteriologia Aplicada da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para a determinação dos grupos filogenéticos. Para extração de DNA, as colônias de *E. coli* previamente isoladas foram plaqueadas em ágar MacConkey. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas durante 18-24 h a 37 °C. Em seguida, foram preparadas suspensões aquosas de cada colônia em microtubos de 1,5 mL contendo 100 µL de TE (10 mM de Tris-HCl 1 mM; EDTA, pH 8,0) e o DNA foi extraído de acordo com Pitcher et al. (1989). As amostras de *E. coli* foram testados para os genes *chuA*, *yjaA*, *arpA*, *trpA* e o fragmento de DNA TSPE4.C2, por meio de uma PCR, para caracterização em grupos filogenéticos de acordo com Clermont et al. (2013).

4.3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados no programa Stata[®]/SE 12.0 (STATA CORP, 2011) e os gráficos foram produzidos com ajuda de planilha de cálculo utilizando o programa Microsoft[®] Office Excel[®] 2010.

Foi estudada associação entre a ocorrência de colibacilose e grupos filogenéticos e entre os o órgão de origem do isolamento de *E. coli* os grupos filogenéticos usando o teste do qui-quadrado. Os resultados foram expressos como cada valor de P. O resultado foi considerado como sendo significativo quando $P \leq 0,05$.

A análise de correspondência (GREENACRE; BLASIUS, 2006) foi usada para estudar a relação entre grupos filogenéticos, órgão de origem (trato respiratório, fígado e coração), característica da carcaça. Na análise de correspondência, a relação entre as categorias foi representada em um gráfico bidimensional e demonstrada por visualização de quais variáveis são plotadas perto o gráfico.

4.4. RESULTADOS

Cento e trinta e sete amostras de *E. coli* foram isoladas de carcaças de frangos de corte. Oitenta e quatro amostras foram isoladas de frangos condenados por colibacilose, dos quais 11 foram obtidos de coração, 7 de fígado e 66 de trato respiratório. Das 53 amostras de *E. coli* isoladas de carcaças de frangos de corte normais e, portanto, liberadas para consumo, 5 foram

isoladas de coração, 4 de fígado e 44 de trato respiratório. A Tabela 4.1 mostra a distribuição dos grupos filogenéticos de amostras *E. coli* obtidas a partir de carcaças condenadas e liberadas para consumo. Os grupos filogenéticos de *E. coli* de acordo com o órgão de origem estão apresentados na Tabela 4.2. Não houve significância estatística entre filogrupos e condição das carcaças ($p = 0,20$). Porém, os filogrupos B2 ($P < 0,001$) e E ($P = 0,044$) foram associadas com amostras isoladas de coração.

Tabela 4.1: Distribuição dos filogrupos de amostras *Escherichia coli* isoladas de carcaças de frango liberadas para consumo (sem alterações macroscópicas) e condenadas ao abate.

Condição da carcaça	Filogrupo							Total
	A	B1	B2	C	D	E	F	
Condenadas	30	35	1	6	3	4	5	84
Liberadas	30	16	1	1	3	1	1	53
Total	60	51	2	7	6	5	6	137

Tabela 4.2. Distribuição dos filogrupos de amostras de *Escherichia coli* isoladas de coração, fígado e trato respiratório de carcaças de frango de corte ao abate.

Órgão de origem	Filogrupo							Total
	A	B1	B2	C	D	E	F	
Coração	5	4	2*	1	1	2*	1	16
Fígado	3	7	0	0	1	0	0	11
Trato respiratório	52	40	0	6	4	3	5	110
Total	60	51	2	7	6	5	6	137

* Identificação dos filogrupos B2 ($P < 0,001$) e E ($P = 0,044$) foram associadas com amostras isoladas de coração.

A análise de correspondência foi realizada para analisar a relação entre os grupos filogenéticos, a origem de origem (fígado, coração e trato respiratório) das amostras de *E. coli* e característica da carcaça (normal ou condenada por colibacilose) (Figura 4.1). A representação bidimensional explica 42,52% da variação total, com 15,59% explicada pela primeira dimensão,

13,86% pela segunda dimensão e 13,07% pela terceira dimensão. De acordo com esta análise, o filogrupo A foi plotado próximo das amostras do trato respiratório, enquanto o filogrupo B1 foi plotado perto das carcaças normais. Amostras de *E. coli* isoladas de carcaças condenadas ficaram perto de ambos os filogrupos A e B1, enquanto que os filogrupos B2 e E ficaram distantes de todas as outras variáveis, porém mais próximos das amostras isoladas do coração. O filogrupo D ficou perto das amostras isoladas do fígado.

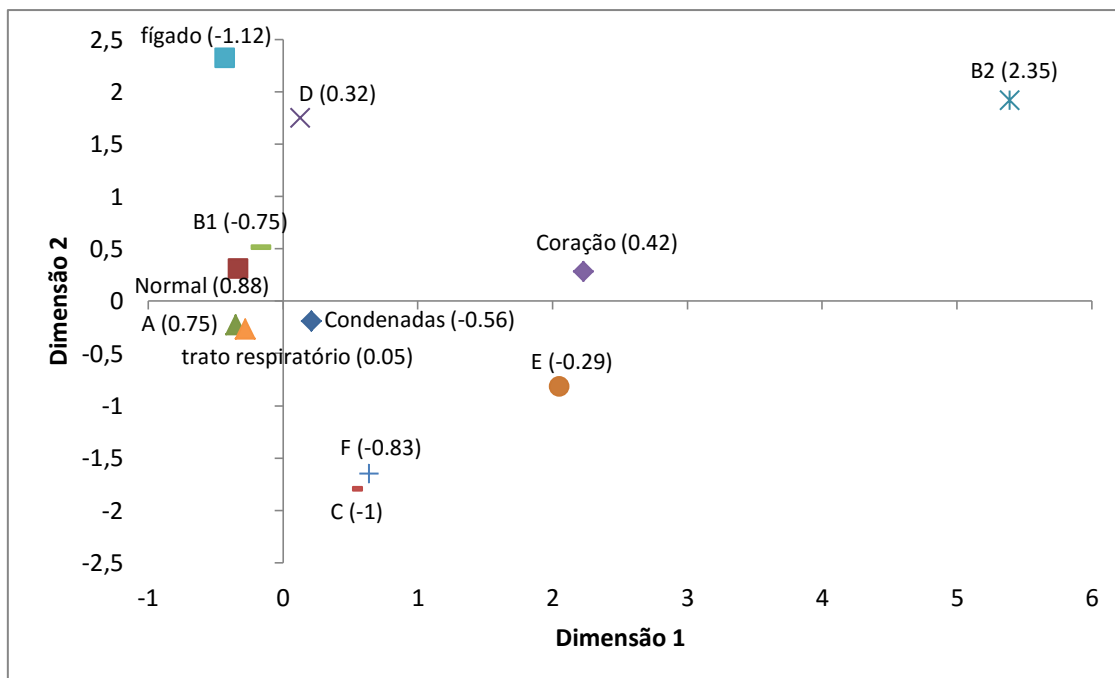


Figura 4.1. Análise de Correspondência para as categorias analisadas. A representação bidimensional explica 42,52% da variação total, com 15,59% explicada pela primeira dimensão, 13,86% pela segunda dimensão e 13,07% pela terceira dimensão. O valor da terceira dimensão é mostrado entre parênteses.

4.5. DISCUSSÃO

O Brasil é um importante produtor de frangos de corte e a colibacilose constitui uma importante causa de condenação de carcaças. No presente estudo, o filogrupo A seguido pelo filogrupo B1 são os mais frequentes filogrupos de *E. coli* isoladas a partir de carcaças de frangos saudáveis, enquanto que o filogrupo B1 seguido pelo filogrupo A são os filogrupos de *E. coli* mais frequentes em carcaças de frangos com colisepticemia. No geral, os filogrupos B2, C, D, E e F foram os menos frequentes. Nos animais, os grupos B1 e A são os mais frequentes (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012), porém considerando somente as aves (silvestres), o filogrupo B1 predomina (GORDON; COWLING, 2003). Resultados semelhantes também foram encontrados no Brasil (KOBAYASHI et al., 2011; MALUTA et al., 2014), Japão (HIKI et al., 2014), Irã (BAGHERI; GHANBARPOUR; ALIZADE, 2014) e Austrália (OBENG et al.,

2012). Um estudo realizado no Sul do Brasil mostrou que o percentual de *E. coli* do filogrupo B1 isolada em carcaças de frango refrigeradas aumentou ao longo dos anos estudados, enquanto que a frequência dos filogrupos B2 e D diminuiu (KOGA et al., 2015). No entanto, alguns estudos encontraram resultados diferentes, nos quais *E. coli* dos filogrupos A e D foram os mais comuns isolados a partir de frangos de corte em Itália (PASQUALI et al., 2015), China (WANG et al., 2010), Canadá (ASLAM et al., 2014) e Irã (GHANBARPOUR et al., 2011).

Filogrupo A foi mais frequente em amostras isoladas de carcaças sem alterações macroscópicas e a análise de correspondência mostrou uma relação entre amostras do filogrupo A e amostras isoladas do trato respiratório, este considerado o primeiro passo de infecção sistêmica por *E. coli* em aves (GUABIRABA; SCHOULER, 2015). A principal forma de infecção com APEC é inalação de poeira contaminada com fezes (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Koga et al. (2015) sugerem que a contaminação das aves ocorre com amostras de *E. coli* comensais. Os resultados do presente trabalho indicam que a contaminação sistêmica ocorre pelas vias respiratórias, tal como sugerido pela literatura, pois amostras de *E. coli* isoladas do trato respiratório e isoladas de carcaças normais foram principalmente do filogrupos A.

Uma baixa frequência do filogrupo B2 foi identificada (1,45%), resultados que estão de acordo com WANG et al. (2010); KOGA et al. (2015); PASQUALI et al. (2015). Em contraste, EWERS et al. (2007); KOBAYASHI et al. (2011); MALUTA et al. (2014) encontraram uma alta frequência do filogrupo B2. O filogrupo D também foi detectado em frequência baixa (4,37%), mas associado às amostras isoladas de fígado na análise correspondência. Os filogrupos B2 e E foram relacionados com amostras isoladas do coração, sendo que na análise de correspondência, apesar de distantes das outras variáveis, ficaram mais perto das amostras isoladas de coração. Em um estudo realizado no Brasil, amostras de *E. coli* isoladas de lesões de celulite em frangos de corte foram principalmente do filogrupo D (BARBIERI et al., 2013). Estudos indicam que os filogrupos B2 e D são considerados *E. coli* patogênica extraintestinal (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012), enquanto que o filogrupo E inclui amostras patogênicas intestinais e amostras de EHEC O157:H7 (CLERMONT et al., 2011). Resumindo, os nossos resultados indicam que B2, D podem ser considerados *E. coli* patogênica extraintestinal para aves assim como para seres humanos e que mais estudos sobre a importância do filogrupo E devem ser realizados para confirmar sua relação com ExPEC, pois apesar de ter sido detectado no coração e trato respiratório, poucas amostras foram identificadas e não foram estudadas amostras de *E. coli* isoladas do intestino.

Apesar de bovinos e outros ruminantes serem considerados os principais reservatórios de STEC/EHEC, outros produtos alimentares podem ser contaminados (BRYAN; YOUNGSTER; MCADAM, 2015). Um estudo no Irã sugere que carcaças de frangos podem ser consideradas uma fonte destes patótipos, incluindo EPEC (BAGHERI; GHANBARPOUR; ALIZADE, 2014). Além disso, estudos sugerem que amostras de APEC podem ser consideradas

relacionadas filogeneticamente a amostras de ExPEC humanas representando um risco zoonótico (EWERS et al., 2007; BAUCHART et al., 2010).

Estudos sobre os grupos filogenéticos de *E. coli* são importantes uma vez que existem evidências da relação entre filogenia e virulência, em que o *background* filogenético é importante para a aquisição e expressão de diferentes fatores de virulência e, portanto, potencial para causar doença (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004). Apesar do presente estudo não avaliar a presença de genes de virulência de APEC, os resultados encontrados fornecem importantes informações sobre a frequência dos diferentes grupos filogenéticos de *E. coli* isoladas de aves, importantes para o entendimento entre *E. coli* e a doença associada a sua infecção.

4.6. REFERÊNCIAS

ASLAM, M. et al. Causes of condemnation of carcasses from poultry in slaughterhouses located in State of Goiás, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 14, ago. 2014.

BAGHERI, M.; GHANBARPOUR, R.; ALIZADE, H. Shiga toxin and beta-lactamases genes in *Escherichia coli* phylotypes isolated from carcasses of broiler chickens slaughtered in Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 16–20, 2014.

BARBIERI, N. L. et al. Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. **PloS One**, v. 8, n. 8, p. e72322, 2013.

BAUCHART, P. et al. Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli* - Search for factors involved in host specificity or zoonotic potential. **Microbial Pathogenesis**, v. 49, n. 3, p. 105–115, 2010.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n.º 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico - sanitária de carne de aves. Brasília, 1998.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento**. Sistema de Informações Gerenciais dos SIF – SIGSIF. <http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/servicos-e-sistemas/sistemas/sif>. Acesso: 02/09/2015.

Brenner, D. J. (1984). **Facultatively anaerobic gram-negative rods: Family I. Enterobacteriaceae** Rahn, 1937. In: Krieg, N. R., & Holt, J. G. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (pp. 408–420). Baltimore: Williams & Wilkins.

BRYAN, A.; YOUNGSTER, I.; MCADAM, A. J. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, p. 247–272, 2015.

CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 214–26, mar. 2012.

CLERMONT, O. et al. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 654–62, abr. 2011.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental microbiology reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, fev. 2013.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–8, out. 2000.

CLERMONT, O.; GORDON, D.; DENAMUR, E. A guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology**, p. 0–20, 2015.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v. 30, p. 299–316, 1999.

ESCOBAR-PÁRAMO, P. et al. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 6, p. 1085–1094, 2004.

EWERS, C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 3, p. 163–176, 2007.

GHANBARPOUR, R. et al. Phylogenetic background and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from colisepticemic and healthy broiler chickens in Iran. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 1, p. 153–157, 2011.

GORDON, D. M. et al. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2484–96, out. 2008.

GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: Host and geographic effects. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3575–3586, 2003.

GREENACRE, M.; BLASIUS, J. **Multiple Correspondence Analysis and Related Methods**. Florida: Chapman-Hall. 2006.

GUABIRABA, R.; SCHOULER, C. Avian colibacillosis: still many black holes. **FEMS Microbiology Letters**, 2015.

GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: GYLES C.A., PRESCOTT J.F., SONGER J.G., THOEN C.O. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p.231-265.

HIKI, M. et al. Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan. **Irish Veterinary Journal**, v. 67, n. 1, p. 14, 2014.

KOBAYASHI, R. K. T. et al. EcoR phylogenetic analysis and virulence genotyping of avian pathogenic *Escherichia coli* strains and *Escherichia coli* isolates from commercial chicken carcasses in southern Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 5, p. 631–634, 2011.

KOGA, V. L. et al. Evaluation of the Antibiotic Resistance and Virulence of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 6, p. 150514115427001, 2015.

KABIR, S. M. L. Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 1, p. 89–114, 2010.

MALUTA, R. P. et al. Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

NAKAZATO, G. et al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479–486, 2009.

OBENG, A. S. et al. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 154, n. 3-4, p. 305–15, 27 jan. 2012.

PASQUALI, F. et al. Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates of animal and environmental origins from an integrated poultry production chain. **Veterinary Microbiology**, v. 178, n. 3-4, p. 230–237, 2015.

PITCHER, D.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 151–156, 1989.

STATACORP. **Stata Statistical Software: Release 12**. College Station, TX. StataCorp LP. 2011.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207–17, mar. 2010.

UBABEF. **União Brasileira de Avicultura**. Relatório Anual. p. 1–35, 2014.

WANG, X-M., LIAO, X-P., ZHANG, W-J., JIANG, H-X., SUN, J., ZHANG, M-J., HE, X-F., LAO, D-X., LIU, Y-H. Prevalence of serogroups, virulence genotypes, antimicrobial resistance, and phylogenetic background of Avian Pathogenic *Escherichia coli* in South of China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 1099–1106, 2010.

5. CAPÍTULO 5: COMPARAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS

5.1. RESUMO

Este estudo determinou os grupos filogenéticos e a distribuição destes grupos entre 529 amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves, bovinos e búfalos. A frequência dos filogrupos foi: A = 15,31%, B1 = 60,49%, B2 = 2,46%, C = 4,35%, D = 2,46%, E = 12,29% e F = 2,64%. Os filogrupos A ($P < 0,001$) e F ($P = 0,002$) foram associados com *E. coli* isoladas de aves, os filogrupos B1 ($P < 0,001$) e E ($P < 0,001$) com *E. coli* isoladas de bovinos, e os filogrupos B2 ($P < 0,001$) e D ($P = 0,007$) com *E. coli* isoladas de búfalos. Os resultados demonstram que alguns filogrupos de *E. coli* estão associados com o hospedeiro estudados o que permite um melhor entendimento da origem filogenética das amostras de *E. coli* isoladas de animais domésticos.

5.2. INTRODUÇÃO

Escherichia coli é uma bactéria Gram negativa, fermentativa, anaeróbia facultativa, que cresce bem em meios bacteriológicos simples, como o MacConkey. *E. coli* compreendem amostras comensais que pertencem a microbiota intestinal normal de seres humanos e muitos animais, e amostras patogênicas, que causam infecções intestinais ou extraintestinais no homem e nos animais. Amostras de *E. coli* patogênicas são classificadas em patotipos baseando-se na presença de fatores de virulência e nos mecanismos pelos quais causam doença (MAINIL, 2013). O ganho e perda de elementos genéticos móveis, tais como bacteriófagos, plasmídeos, e ilha de patogenicidade, em diferentes amostras de *E. coli* permitiram a evolução de clones de forma independente que pertencem a diferentes patotipos de *E. coli*. Desde os determinantes de virulência, bem como *background* genético das amostras, são compartilhados entre os diferentes patotipos (DOBRINDT, 2005).

As *E. coli* podem causar doenças entéricas e extraintestinais nos animais. *E. coli* patogênica aviária (APEC) está associada principalmente com infecções extraintestinais e com celulite nas aves (NAKAZATO et al., 2009). Infecções por EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), especialmente O157:H7, resultam em colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica em seres humanos. Alimentos de origem animal contaminados com essas amostras são considerados a principal forma de transmissão de EHEC para os seres humanos. Além do leite cru e carnes contaminados, carcaças de frangos são consideradas uma importante fonte de EHEC (BAGHERI; GHANBARPOUR; ALIZADE, 2014).

A identificação de alguns genes pode ser usada para classificar as amostras de *E. coli* em filogrupos. O surgimento do MLST (*multi-locus sequence typing*) permitiu o conhecimento dos grupos filogenéticos de *E. coli* A, B1, B2, C, D, E e F (CLERMONT et al., 2013). MLST é a melhor técnica de tipificação de amostras de *E. coli*, mas o tipo de sequência (ST) fornecida

na análise não permite diretamente a classificação em filogrupos sendo necessário determinar a correspondência entre ST e filogrupos, com esta última realizada por meio do "método de Clermont" (CLERMONT et al., 2013; CLERMONT; GORDON; DENAMUR, 2015).

O conhecimento da estrutura genética da *E. coli* permitiu a sua classificação em diferentes grupos filogenéticos ou filogrupos, que parecem estar relacionados com a fonte de isolamento da amostra bacteriana. O filogrupo F é composto de linhagens que formam um grupo irmão do filogrupo B2. O filogrupo C parece estar relacionados com o filogrupo B1. Apesar das suas vantagens sobre o a PCR-triplex, a PCR quadruplex não atribui um grupo pequeno de amostras a um grupo filogenético. Essas falhas ocorrem porque uma pequena fração de amostras de *E. coli* não podem ser classificadas em filogrupos provavelmente devido a recombinações entre amostras de filogrupos diferentes ou devido à alta variabilidade do conteúdo genético de *E. coli*, que ocorre através de ganhos e perdas de genes (CLERMONT et al., 2013).

Os filogrupos A, seguido de B2 são os filogrupos mais frequentes de *E. coli* isoladas de seres humanos, enquanto os filogrupos B1 e D são os menos frequentes. Os filogrupos B1 seguido de A, B2 e, em menor grau, de D são os mais comuns de *E. coli* isoladas de animais. Características como dieta, morfologia intestinal, massa corporal e localização geográfica interferem na frequência dos filogrupos de *E. coli*. Em animais, a domesticação parece ser também um fator que interfere na frequência dos diferentes grupos filogenéticos. Apesar do elevado grau de fluxo de genes, a estrutura genética desta população espécies continua a ser principalmente clonal, com a delimitação de, pelo menos, sete grupos principais filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E e F) (TENAILLON et al., 2010).

A identificação dos filogrupos é importante para compreender como *E. coli* causa doença. Existem três *MLST databases* para *E. coli* baseadas em três combinações de genes diferentes com apenas um gene em comum, *icd*. A razão para a escolha dos genes utilizados nas diferentes técnicas de MLST não é claro, mas os genes usados são todos constitutivos (*housekeeping*). Embora o MLST seja uma técnica com melhor poder de classificação de amostras de *E. coli*, não fornece diretamente informações relativas ao grupo filogenético, sendo necessário utilizar o "método de Clermont" (CLERMONT; GORDON; DENAMUR, 2015), que originalmente classificou *E. coli* em quatro principais grupos filogenéticos A, B1, B2 e D (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000), e mais recentemente foi aprimorado e identifica os esses mesmos filogrupos mais os filogrupos C, E e F (CLERMONT et al., 2013).

Pouco se sabe sobre as relações entre os grupos filogenéticos de *E. coli* e a especificidade de hospedeiros. Os estudos sugerem que as infecções extraintestinais são causadas principalmente pelo filogrupo B2, enquanto as infecções intestinais são causadas principalmente pelos filogrupos A, B1 e E. Os filogrupos F e B2 são os mais basais, surgindo primeiro, enquanto que os filogrupos A e B1 e C divergiram mais recentemente. Além disso,

uma estrutura genética clara foi identificada dentro do grupo filogenético B2, com pelo menos nove subgrupos (I-IX). O grupo D é mais diverso que o grupo C, que é mais clonal. O filogrupo E é mais clonal enquanto os filogrupos A e B1 são mais diversos (CLERMONT et al., 2011). O *background* genético é importante para aquisição, retenção e expressão do DNA novo adquirido (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004).

O conhecimento da composição genética das amostras bacterianas é importante para os estudos de epidemiologia molecular e para a melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade e, portanto, desenvolvimento de métodos de diagnóstico, medicamentos e vacinas melhores (DOBRINDT, 2005).

O conhecimento dos filogrupos de *E. coli* mostrou que os filogrupos não são dispersos de forma aleatória podendo estar associados com o hospedeiro e doença clínica (CLERMONT et al., 2013). Estudos sobre os grupos filogenéticos de *E. coli* são importantes para o entendimento da relação entre comensalismo e patogenicidade de *E. coli* e sua relação com hospedeiro e doença (TENAILLON et al., 2010). Portanto, este estudo tem por objetivo analisar a ocorrência e distribuição de grupos filogenéticos de *Escherichia coli* isoladas de diferentes animais domésticos.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. AMOSTRAS E DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DE *E. COLI*

Amostras de *E. coli* foram isolados das fezes de bezerros bovinos e bubalinos. Um grama de fezes foi diluído em 3,0 mL de PBS pH 7,2. A partir dessa suspensão, 1,0 mL foram inoculados em 9,0 mL de água de peptona tamponada que foi incubada durante 18-24 h a 37° C. Após incubação, as culturas foram plaqueadas em placas de ágar de MacConkey e incubadas a 37° C durante 18-24 h. Até três colônias de cada placa de ágar, com característica de *E. coli* foram identificadas bioquimicamente (QUINN et al., 1994). As amostras de *E. coli* foram isoladas de carcaças de frango de um matadouro com serviço de inspeção federal e foram obtidas a partir do trato respiratório, fígado e coração de carcaças. Utilizando um *swab* de haste de plástico estéril, foram coletados esfregaços dos tecidos citados anteriormente e colocados em 0,9 mL de solução salina a 0,85%. As amostras foram processadas individualmente, de acordo Quinn et al. (1994) para o isolamento e identificação de *E. coli*. A caracterização dos filogrupos A, B1, B2, C, D, E e F de *E. coli* foi realizada por meio de uma PCR de acordo com a Clermont et al. (2013). O DNA amplificado foi resolvido em um gel de agarose a 2%, corados com 0,5 µg/mL de brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta.

5.3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Stata[®]/SE 12.0 (STACORP, 2011). Foi estudada a associação entre o animal doméstico e o filogrupo de *E. coli* usando o teste do qui-quadrado. Os resultados foram expressos com o valor de P. O resultado foi considerado como sendo significativo se $P \leq 0,05$. A análise de correspondência foi usada para comparar as categorias hospedeiro e filogrupo usando o Stata[®]/SE 12.0 (STACORP, 2011). Na análise de correspondência, a relação entre as categorias é representada num gráfico bidimensional.

5.4. RESULTADOS

Quinhentos vinte e nove amostras de *E. coli* foram utilizadas no estudo e o grupo filogenético de *E. coli* determinado (Tabela 5.1). A frequência de filogrupos foi: A = 15.31%, B1 = 60.49%, B2 = 2.46%, C = 4.35%, D = 2.46%, E = 12.29% e F = 2.64%.

Tabela 5.1: Distribuição dos filogrupos de *E. coli* de acordo com o animal doméstico analisado.

Animal	Filogrupo							Total
	A	B1	B2	C	D	E	F	
Aves	64	51	3	10	6	6	9	149
Bovinos	14	190	2	5	0	46	3	260
Búfalo	3	79	8	8	7	13	2	120
Total	81	320	13	23	13	65	14	529

A análise de qui-quadrado foi realizada para verificar a associação entre o hospedeiro e o grupo filogenético de *E. coli*. Os filogrupos A ($P < 0,001$) e F ($P = 0,002$) foram associados com amostras de *E. coli* isoladas de aves, enquanto os filogrupos B1 ($P < 0,001$) e E ($P < 0,001$) foram associados com amostras de *E. coli* isoladas de bovinos. Os filogrupos B2 ($P < 0,001$) e D ($P = 0,007$) foram associados com amostras de *E. coli* isoladas de búfalos.

Uma análise de correspondência foi realizada utilizando os hospedeiros e os filogrupos de *E. coli*. A representação bidimensional da distribuição dos filogrupos em cada um dos três hospedeiros é mostrada na Figura 5.1. A representação bidimensional explica 100% de variação total, com 83,38% explicada pela primeira dimensão e 16,62% pela segunda dimensão.

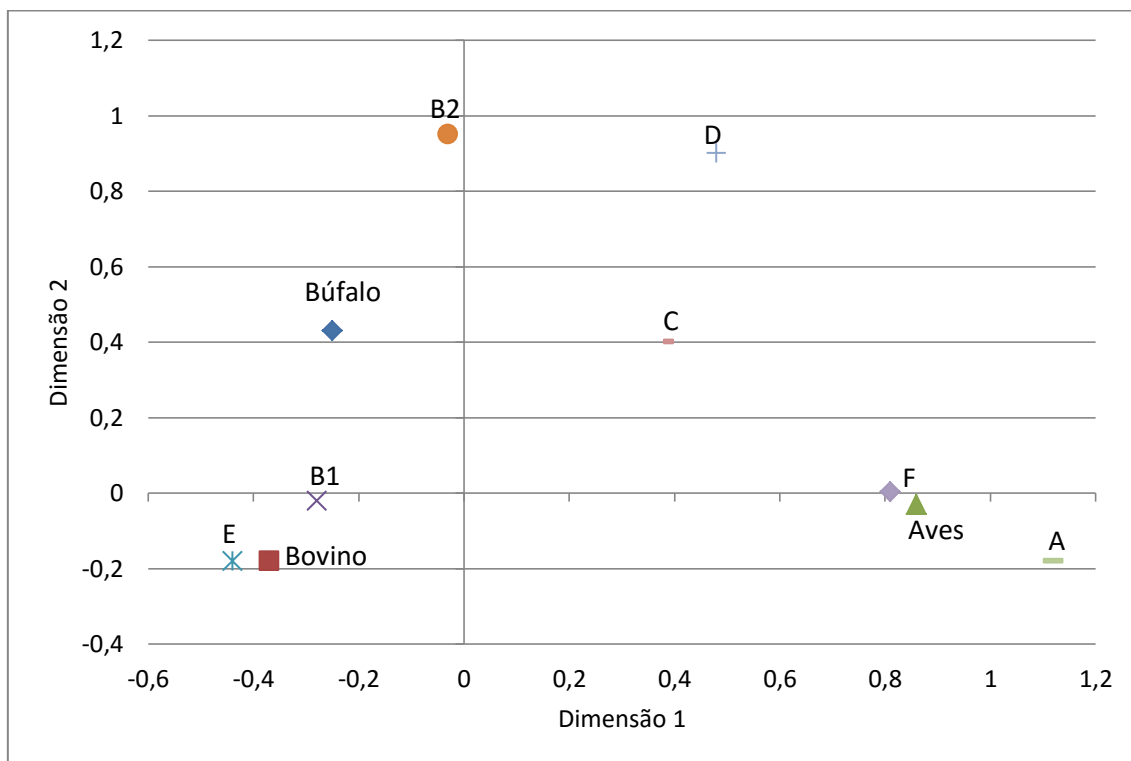


Figura 5.1: Análise de Correspondência para as categorias tipo de hospedeiro e filogrupo de *E. coli*. O gráfico bidimensional explica 100% da variação total, com 83,38% explicada pela primeira dimensão e 16,62% pela segunda dimensão.

5.5. DISCUSSÃO

Este estudo determinou os grupos filogenéticos de amostras de *E. coli* isoladas de aves, bezerros bubalinos e bezerros bovinos e demonstrou que alguns grupos filogenéticos estão associados com o hospedeiro analisado. Estudos filogenéticos permitem maior entendimento da relação entre *E. coli*, hospedeiro e doença (TENAILLON et al., 2010). Além disso, animais de produção, como bovinos, búfalos e de aves, representam uma importante fonte de contaminação por EHEC na cadeia alimentar (MARTIN; BEUTIN, 2011). A produção de bovinos e bubalinos são atividades econômicas importantes no Brasil (OLIVEIRA et al., 2008). Além disso, o Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango e o maior exportador deste produto (UBABEF, 2012).

Nossos resultados indicam que B1 é a principal filogrupos de amostras de *E. coli* isoladas de animais domésticos, seguido do filogrupos A. Os resultados do teste do qui-quadrado e Análise de Correspondência concordaram e mostraram que os filogrupos B1 e E estão associados com *E. coli* isoladas de bovinos e os filogrupos A e F com aves. No entanto, amostras de *E. coli* de isoladas de bubalinos foram associados com os filogrupos B2 e D no teste do qui-quadrado, mas a análise de correspondência não indicou associação clara entre o hospedeiro e os filogrupos. Amostras de *E. coli* extraintestinal (ExPEC) estão agrupados principalmente no grupo B2 e D (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004). Nossos resultados indicam que amostras de *E. coli* isoladas de bezerros bubalinos possuem características de ExPEC.

Estudos têm mostrado que o grupo filogenético A é a mais comum de amostras de *E. coli* obtidas de animais omnívoros e B1 o filogrupos mais comum amostras de *E. coli* isoladas de mamíferos herbívoros (BALDY-CHUDZIK; MACKIEWICZ; STOSIK, 2008; CARLOS et al., 2010). De acordo com Gordon e Cowling (2003), o habitat do hospedeiro, a dieta, a morfologia do intestino e massa corporal influenciam na distribuição do grupos filogenéticos de *E. coli* nos animais. Nos animais domésticos analisadas no nosso estudo, dieta e morfologia intestinal podem ter influenciado a distribuição dos grupos filogenéticos e a análise de correspondência, que apresentou um qui-quadrado acumulado de 100%, pode ser utilizada para estudos de epidemiologia molecular para determinar a distribuição dos grupos filogenéticos de *E. coli* entre os diferentes hospedeiros.

A análise de correspondência é uma técnica de análise exploratória de dados categóricos não contínuos que permite estudar as relações existentes entre as categorias estudadas que converte uma matriz de dados para uma representação gráfica, na qual as linhas e colunas são descritas como pontos. A sua natureza multivariada permite analisar relações que não seriam detectadas em comparações aos pares das variáveis (GREENACRE; HASTIE, 1987). A análise de correspondência examina a relação entre os dados nominais categóricos usando uma tabela de contingência das variáveis categóricas e transforma os dados não métricos em dados métricos, permitindo a visualização dos dados em um mapa, no qual, quanto maior a associação, mais próximas as variáveis estão no mapa (HAIR, 2010). Ainda que a análise de correspondência possa ser usada para avaliar associações complexas entre variáveis, às vezes não é suficiente para completamente avaliar tais associações entre as variáveis e, portanto, sugere-se usar outra análise simples (por exemplo, qui-quadrado) ou análise multivariada (por exemplo, a regressão logística) em conjunto para complementar os procedimentos analíticos (DOHOO, 1997).

Técnicas moleculares como sequenciamento do gene 16S rRNA e MLST são de alto custo. MLST não fornece informações diretas sobre o grupo filogenético de *E. coli*, que depende do "método de Clermont" (CLERMONT; GORDON; DENAMUR, 2015). O nosso estudo mostrou que os diversos grupos filogenéticos de *E. coli* estão presentes nas três espécies animais estudadas, no entanto, o teste do qui-quadrado e a análise de correspondência indicam

alguma especificidade de hospedeiro, resultado importante para o entendimento entre *E. coli* e doença que causa em cada animal. A PCR usada para identificar os sete grupos filogenéticos foi desenvolvida recentemente (CLERMONT et al., 2013) e a sua utilização é rara na literatura. Nossos resultados fornecem conhecimento da composição filogenética de *E. coli* provenientes de animais domésticos.

5.6. REFERÊNCIAS

BAGHERI, M.; GHANBARPOUR, R.; ALIZADE, H. Shiga toxin and beta-lactamases genes in *Escherichia coli* phylotypes isolated from carcasses of broiler chickens slaughtered in Iran. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 16–20, 2014.

BALDY-CHUDZIK, K.; MACKIEWICZ, P.; STOSIK, M. Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 1-2, p. 173–184, 2008.

CARLOS, C. et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 161, 2010.

CHAUDHURI, R. R.; HENDERSON, I. R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 214–26, mar. 2012.

CLERMONT, O. et al. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 654–62, abr. 2011.

CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, fev. 2013.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–8, out. 2000.

CLERMONT, O.; GORDON, D.; DENAMUR, E. A guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology**, v. 161, p. 980–988, 2015.

DOBRINDT, U. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 357–71, out. 2005.

ESCOBAR-PÁRAMO, P. et al. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 6, p. 1085–1094, 2004.

GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: Host and geographic effects. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3575–3586, 2003.

MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1-2, p. 2–12, 15 mar. 2013.

MARTIN, A.; BEUTIN, L. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 1, p. 99–104, 2011.

NAKAZATO, G. et al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479–486, 2009.

OLIVEIRA, M. G. et al. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 1-2, p. 139–46, 30 set. 2008.

QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe, London. 1994.

STATACORP. **Stata Statistical Software: Release 12**. College Station, TX. StataCorp LP. 2011.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207–17, mar. 2010.

UBABEF. **União Brasileira de Avicultura**. Relatório Anual. p. 1–35, 2014.

CONCLUSÕES GERAIS

E. coli é um importante agente causador de diarreias em bovinos. A identificação de fatores de virulência e a análise filogenética são ferramentas de epidemiologia molecular úteis no estudo de *E. coli* patogênica e fornecem conhecimento para o entendimento da patogenicidade e comensalismo de amostras de *E. coli*.

No estudo com *E. coli* isoladas de fezes de bezerros bovinos, todos os patotipos foram identificados, porém somente ETEC foi associado com a presença de diarreia e os fatores de virulência característicos do patotipo *E. coli* enteroagregativa (EAEC) não foram identificados em fezes de bezerros bovinos. Amostras de *E. coli* dos patotipos EHEC e EAEC (EAST-1) foram os mais frequentes. Os filogrupos mais frequentes foram os B1, E e A. EHEC e STEC são classificados principalmente como filogrupo B1, amostras EAST-1⁺ como filogrupo A, ETEC e EPEC como filogrupo E. Além disso, os filogrupos B1 e E são os mais comuns, sendo os filogrupos B2, D e F os menos comuns.

No estudo com *E. coli* isoladas de fezes de bezerros bubalinos, *E. coli* EAST-1 positiva e, em menor grau, os patotipos NTEC e STEC, parecem ser importantes agentes de diarreia. Ao contrário, os patotipos ETEC e EPEC não são tão importantes. O filogrupo B1 predomina e o filogrupo C pode estar associado a uma maior ocorrência de diarreia. Com relação à associação entre patotipo e filogrupo, NTEC pertence principalmente aos filogrupos B2 e D, EPEC, EHEC e EAEC (amostras positivas para EAST-1) ao filogrupo B1, e ETEC ao filogrupo F.

Entre as APEC estudadas, o filogrupo A seguido pelo filogrupo B1 são os mais frequentes filogrupos de *E. coli* isoladas a partir de carcaças de frangos saudáveis, enquanto que o filogrupo B1 seguido pelo filogrupo A são os filogrupos de *E. coli* mais frequentes em carcaças de frangos com colisepticemia. No geral, os filogrupos B2, C, D, E e F são os menos frequentes.

Os diversos grupos filogenéticos de *E. coli* estão presentes nas três espécies animais estudadas (bovina, bubalino e aves). O filogrupo B1 é o principal filogrupo de amostras de *E. coli* isoladas de animais domésticos, seguido do filogrupo A. No entanto, os filogrupos B1 e E estão associados com *E. coli* isoladas de bovinos e os filogrupos A e F com aves. Amostras de *E. coli* de isoladas de bubalinos estão associados com os filogrupos B2 e D.