

**PCR MULTIPLEX PARA DETERMINAÇÃO DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA
EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE BOVINOS COM DIARRÉIA EM MINAS
GERAIS**

Giovanna Ivo Andrade¹, Ethiene Luiza de Souza Santos², Fernanda Morcatti Coura², Alice Alexandrina Souza Cunha², Abel Fidelis Barbosa², Mariana Moraes Falcão², Juliana Pinto da Silva Mol³, Marina Guimarães Ferreira⁴, Moises Dias Freitas⁴, Elias Facury Filho⁵, Antônio Último de Carvalho⁵, Paulo Marcos Ferreira⁵, Marcos Bryan Heinemann⁵, Andrey Pereira Lage⁶

1. Bióloga, MSc, Doutora, Bolsista PróDoc CAPES / UFMG, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
2. Bolsista de Iniciação Científica, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
3. Bióloga, MSc, Doutoranda, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
4. Médico Veterinário, MSc, Doutorando, Escola de Veterinária, UFMG
5. Médico Veterinário, MSc, Doutor, Professor, Escola de Veterinária, UFMG
6. Médico Veterinário, MSc, DSc, Professor, Laboratório de Bacteriologia Aplicada, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, Caixa Postal 567, Campus da UFMG, CEP 30123-970, Belo Horizonte, MG, Brasil.
E-mail: alage@vet.ufmg.br (autor correspondente)

PALAVRAS-CHAVE: EPEC, epidemiologia, ETEC, fatores de virulência, STEC

ABSTRACT

**PCR MULTIPLEX FOR THE DETERMINATION OF VIRULENCE FACTORS IN
ESCHERICHIA COLI ISOLATES FROM CALVES WITH DIARRHEA**

Diarrhea is one of the most common diseases in calves and leads to substantial economic loss due to treatment costs, increased mortality and morbidity rates, and growth constraints. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), attaching and effacing *E. coli* (AEEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) have been identified as causes of diarrhea and dysentery in calves. This study investigates virulence factors of *E. coli* strains isolated from calves by multiplex PCR. The animals were up to 60 days old and were raised in Minas Gerais State, Brazil. Samples were obtained from semi-intensive dairy farms in the center-west and Alto Paranaíba regions of Minas Gerais. Feces were collected and processed routinely. The DNA

templates of *E. coli* strains were subjected to multiplex PCR for the detection of the genes encoding the virulence factors Stx1, Stx2, Int, F41, K99, and STa. Out of 156 isolates, 51 (32,7%) were positive, whereas 105 (67,3%) did not present any of the virulence factors investigated. Results show that *E. coli* is an important cause of diarrhea in calves in Minas Gerais and that multiplex PCR test is a useful tool for the identification and characterization of pathogenic *E. coli* strains.

KEYWORDS: EPEC, epidemiology, ETEC, STEC, virulence factors.

INTRODUÇÃO

A diarréia neonatal é a síndrome mais importantes na criação de bezerras, pois causa altas perdas econômicas decorrentes dos custos com tratamento de animais, aumento dos índices de mortalidade e morbidade e redução nas taxas de crescimento (OK et al., 2009). A síndrome diarréica tem etiologia e patogênese complexa, com vários agentes infecciosos envolvidos, sendo a *Escherichia coli* um dos agentes mais importantes tanto em casos de diarréia como em infecções extra-intestinais (BEUTIN et al., 2004). Amostras de *E. coli* isoladas de ruminantes domésticos, principalmente bovinos, foram relatadas como causa de gastroenterite em humanos, que poderia progredir para Colite Hemorrágica e Síndrome Urêmica Hemolítica (GÜLER et al., 2008).

E. coli patogênicas identificadas como causadoras de diarréia em bezerros são classificadas, segundo os sinais clínicos e suas características de virulência em: enterotoxigênicas (ETEC), “attaching and effacing” (AEEC), enteropatogênicas (EPEC) e produtoras de toxinas do tipo Shiga (STEC), sendo que se as amostras STEC apresentarem atividade “attaching and effacing” são ditas enterohemorrágicas (EHEC). Fímbrias K99 e/ou F41 e a enterotoxina Sta são os fatores de virulência de ETEC comumente isoladas de bezerros, que participam da aderência ao íleo e causam hipersecreção no lúmen do intestino, respectivamente. A proteína intimina participa da atividade de adesão ao enterócito e destruição das microvilosidades intestinais em AEEC. Amostras do tipo EPEC possuem atividade AE (“attaching and effacing”) e não produzem enterotoxinas ou toxinas do tipo Shiga. STEC produzem toxina Shiga imunologicamente similar (Stx1) e imunologicamente distinta à toxina de *Shigella dysenteriae* (Stx2). *E. coli* enterohemorrágica, como o sorotipo O157:H7, possui atividade AE e produz toxinas Shiga do tipo 1, 2 ou ambas (FRANCK et al., 1998).

O diagnóstico da infecção por *E. coli* baseia-se na diferenciação fenotípica entre amostras patogênicas e não patogênicas. Testes de aglutinação e ELISA são usados para a detecção de fímbrias e ensaios biológicos complexos são comumente usados para a detecção de enterotoxinas. Esses testes são, no entanto, laboriosos e complexos para uso em rotina. Métodos moleculares mais práticos, rápidos, específicos e sensíveis como a PCR vêm sendo empregados para a detecção de uma variedade de genes de virulência. PRC *multiplex* para a identificação e diferenciação de ETEC, EPEC e STEC via amplificação simultânea de genes associados à virulência comumente encontrados em amostras de *E.coli* causadoras de diarreia foram desenvolvidos para diagnóstico de diarreia em bezerros (FRANCK et al., 1998). No presente trabalho foi empregada utilizada a PCR *multiplex* (FRANCK et al., 1998) para a tipagem de *Escherichia coli* patogênicas causadoras de diarreia em bezerros do Estado de Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e preparo das amostras

As coletas foram feitas em 20 propriedades leiteiras semi-intensivas nas regiões Centro-Oeste e do Alto Paranaíba em Minas Gerais, divididas em 10 propriedades por região. Foram selecionadas bezerras em idade de aleitamento, alojadas em sistemas de criação individuais (casinhas, sistema argentino, piquetes individuais ou amarrados) e coletivos. Amostras fecais de 133 bezerros de até 60 dias de idade foram coletadas e submetidas à coprocultura. O escore de fezes foi classificado em normais, pastosas, aquosas e presença de sangue nas fezes.

Cerca de 1g de fezes foi diluído em PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7,2) e adicionado em meio não seletivo de pré-enriquecimento (água peptonada), com tempo de incubação de 24 h à 37°C. A identificação das enterobactérias foi realizada por provas bioquímicas de rotina (FONTES, 1979). Amostras identificadas como *E. coli* nos testes bioquímicos foram semeadas em placas contendo BHI sangue por 14 – 16h a 37°C. Após, foram preparadas suspensões aquosas de cada amostra em microtubos de 1,5 mL, de modo a obter $9,0 \times 10^8$ células/mL. Em seguida, foi feita extração térmica do DNA por 10 minutos a 100°C e breve centrifugação (2 min.) a 10.500 x g. O sobrenadante foi usado para a tipagem molecular do fatores de virulência das amostras de *E. coli* pela PCR *multiplex* (FRANCK et al., 1998).

PCR *Multiplex*

O método foi baseado em FRANCK et al. (1998), com modificações. A reação de PCR foi realizada a partir de 5 µL de cada DNA extraído e 15µL da solução mix, contendo 0,2µM de cada iniciador (Stx1 F/R, Int F/R, F41 F/R, K99 F/R, Sta F/R, Stx2 F/R) (IDT - Integrated DNA Technologies, ,USA), 0,2 mM de dNTP mix dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Invitrogen, USA), 1,5 U de Taq DNA polimerase, tampão Taq 1X, 1,5 mM de MgCl₂ (Phoneutria Biotecnologia, Brasil) e água estéril ultra-pura para um volume final de 20µL. A reação de amplificação consistiu de 1 passo de 3 min a 94°C seguido por 30 ciclos de 45 s a 94°C, 51,5°C e 70°C e 1 passo final de extensão de 10 min a 72°C. Foram utilizadas duas amostras de referência como controles positivos (*Escherichia coli* B41 – F41⁺, K99⁺, Sta⁺ e *Escherichia coli* CDC EDL 933, O157:H7 – ATCC 43895TM). Controles negativos incluíram a adição da amostra de *E. coli* DH5- α e água estéril ultra-pura ao mix da reação. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo (10mg/mL) em tampão TBE (Tris base 0,89M,Ácido Bórico 0,45M, EDTA 1mM, pH 8,4) e visualizados sob luz UV. Como marcador de tamanho molecular foi usado o 100 bp e as amostras de referência amplificadas no mesmo tubo de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 133 amostras de fezes submetidas ao isolamento e identificação de enterobactérias, 120 foram positivas para *Escherichia coli* (90,22%). Dessas 120 amostras, foram selecionados 156 isolados (48,9%) de *E. coli* pelos testes bioquímicos. Os resultados da PCR *multiplex* mostraram que destes 156 isolados, 105 (67,3%) foram negativos para fatores de virulência e 51 (32,7%) apresentaram resultado positivo para vários genes marcadores de virulência.

A diarreia por *E. coli* tem sido apontada como a enfermidade mais importante de bovinos jovens, com variação nos índices de morbidade e mortalidade dependentes do sistema de criação, agente envolvido e capacidade de resposta do organismo. O manejo é o fator que mais influencia as taxas de mortalidade dos bezerros jovens. Fatores como má higiene, colostragem mal feita, parto não monitorado e tempo prolongado de permanência com a mãe podem ser decisivos no aparecimento de diversas doenças em bezerros, dentre elas as diarreias (RADOSTITS et al., 2007). A maioria das propriedades (95%) incluídas neste estudo não utilizava vacinação contra agentes específicos de enterites e apresentava condições

inadequadas de manejo, resultando em índices elevados de detecção de fatores de virulência presentes em *E. coli* enteropatogênicas

Diarréia em bezerros é comumente causada por ETEC (HOLLAND, 1990). Neste estudo, *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) foram detectadas em 24 (~ 47%) de 51 amostras positivas na PCR *multiplex*, congruente com dados da literatura (GÜLER et al., 2008). De 51 isolados, 22 (~ 43%) representaram o total de STEC detectadas, com 15 (29,4%) positivos para Stx1 e 6 (11,8%) positivos para ambos, Stx1 e Int. Resultado semelhante foi encontrado por SALVADORI et al. (2003), pontuando a importância do gado como reservatório de STEC no Brasil, o que representa um risco potencial à saúde humana (SALVADORI et al., 2003; AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007). Foram encontradas cinco amostras (9,8%) positivas para o gene marcador de virulência (*eae*) para a proteína de adesão íntima, íntima. GÜLER et al. (2008) também detectaram poucas amostras positivas para o gene *eae* em bezerros na Turquia. Segundo HOLLAND (1990), a prevalência de infecções verdadeiras por EPEC parece ser baixa em bovinos.

A PCR em formato *multiplex* usada neste estudo permitiu a detecção simultânea de genes de virulência de *E. coli*, provando ser um método de diagnóstico rápido e eficiente. O uso deste método para o diagnóstico e tipagem de enteropatógenos em amostras fecais de bovinos tem aumentado nos últimos anos e serve para a detecção de uma variedade de fatores de virulência de *E. coli* em vários tipos de amostras e diferentes hospedeiros.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que *E. coli* é um importante patógeno causador de diarréia em bezerros em Minas Gerais e que a PCR *multiplex* empregada nesse estudo é uma ferramenta útil para identificação e caracterização de isolados de *E. coli* de bovinos com diarréia.

AGRADECIMENTOS

A Fapemig, CNPq e FEP-MVZ Coordenação Preventiva pelo auxílio financeiro. GIA é bolsista da Capes, ELSS, FMC, AASC, e AFB da Fapemig e MGF, MDF e APL do CNPq.

REFERÊNCIAS

AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M. 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**, Amsterdam, v. 115, p. 297-306, 2007.

BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S. et al. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 1099-1108, 2004.

FONTES, C. F. **Proposição de dois novos meios de cultura e de um sistema simplificado para identificação de Enterobactérias**. 78p. 1979. Tese (Mestrado em Microbiologia e Imunologia) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

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**, Washington, v. 36, p. 1795-1797, 1998.

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

HOLLAND, R. E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 3, p. 345-375, 1990.

OK, M.; GÜLER, L.; TURGUT, K. et al. The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. **Zoonoses Public Health**, Berlin, v. 56, p. 94-101, 2009.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10.ed. Philadelphia: Elsevier, 2007, 2156p.

SALVADORI, M. R.; VALADARES, G. F.; LEITE, D. S. et al. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 230-235, 2003.