



tado do Pará, foram relatados surtos de periodontite em ovinos com as mesmas características bacteriológicas, clínico-patológicas e epidemiológicas de bovinos (Silva, 2015). Uma particularidade do abscesso periodontal, descrita em humanos é a sua associação com a periodontite e a etiologia polimicrobiana, semelhante à da infecção periodontal (Sanz et al. 2010). Nesse particular, o que ocorre em ovinos aparentemente assemelha-se ao que ocorre também em humanos. Os resultados originais indicam a presença de patógeno convencional, associado a periodontopatógenos na etiologia dos abscessos e a sua provável associação com a ocorrência da periodontite ovina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Botteon, RCM; Dutra, IS; Döbereiner, J; Blobel, H. 1993. Caracterização de bactérias anaeróbias isoladas de lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 13(3/4): 51-55.
- Döbereiner, J; Dutra, IS; Rosa, IV; Blobel, H. 2000. “Cara inchada” of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependent periodontitis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 20(2): 47-64.
- Dutra, IS; Kanoe, M; Blobel, H. 1986. Atividades enzimáticas e endotóxicas de bacté-

rias isoladas de lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 6(2): 59-63.

- Dutra, IS; Matsumoto, T; Döbereiner, J. 1993. Surtos de periodontite em bezerros (“cara inchada”) associa-dos ao manejo do solo. *Pesq. Vet. Bras.* 13(1/2): 1-4.
- Dutra, IS; Botteon, RCM; Döbereiner, J. 2000. Modificação da microbiota associada às lesões peridentárias da “cara inchada” em bezerros transferidos para área indene. *Pesq. Vet. Bras.* 20(2): 71-74.
- Gaetti-Jardim Jr, E; Monti, LM; Ciesielski, FIN; Gaetti-Jardim, EC; Okamoto, AC; Schweitzer, CM; Avila-Campos, MJ. 2012. Subgingival microbiota from *Cebus paella* (capuchin monkey) with different periodontal conditions. *Anaerobe* 18: 263-269.
- Sanz, M; Herrera, D; Winkelhoff, A.J. 2010. O Abscesso Periodontal, p. 474-481. In: Lindhe, J; Lang, N.P; Karring, E. (Eds), *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 5a. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1340p.
- Silva, NS. 2015. Periodontite ovina no estado do Pará: aspectos epidemiológicos, clínico-patológicos e bacteriológicos. Tese de Doutorado em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

CARACTERIZACIÓN DE ESCHERICHIA COLI ASOCIADA A LA DIARREA NEONATAL DE TERNEROS EN URUGUAY

Ana Umpiérrez^a, Sofía Acquistapace^{a,b}, Martín Oliver^a, Sofía Fernández^a,
Patricia Acuña^b, Eduardo Reolón^b, Pablo Zunino^a

^a Da Departamento de Microbiología. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Avenida Italia, 3318. CP: 11600. Montevideo, Uruguay. - ^b Departamento de Investigación y Desarrollo. Laboratorios Santa Elena-VIRBAC SA. Avenida Millán 4175. CP: 12900. Montevideo, Uruguay.

SUMMARY

Livestock production is an important economic activity in Uruguay and neonatal calf diarrhea (NCD) is one of the most important infectious diseases affecting dairy and beef calves. Therefore, NCD generates great economic losses each year worldwide as a result of increased morbidity and mortality. *Escherichia coli* is one of the pathogens associated with this disease and previous studies in our laboratory have detected the presence of this pathogen in feces of sick calves in Uruguay. The objective of this study was to evaluate virulence characteristics

of *E. coli* associated with NCD in our country, isolated from feces of healthy and sick calves throughout Uruguay. To accomplish this, the presence of nine genes encoding important virulence factors (adhesins and toxins) of *E. coli* was analyzed in the collection of strains. We identified the presence of all virulence genes tested, with varying prevalence values, but similar to those reported in Argentina and Brazil. Also, the genetic diversity of isolates by rep-PCR technique was analyzed, showing a high heterogeneity of *E. coli* strains collection.



RESUMEN

La producción pecuaria es una actividad económica fundamental en Uruguay y la diarrea neonatal de terneros (DNT) es una de las enfermedades infecciosas más importantes que afecta a terneros de leche y de carne recién nacidos. Esta entidad genera grandes pérdidas económicas cada año en todo el mundo como consecuencia del aumento de la morbilidad y la mortalidad. *Escherichia coli* es uno de los patógenos asociados a esta enfermedad y reportes previos realizados en nuestro laboratorio han detectado su presencia en heces de terneros enfermos en Uruguay. El objetivo general de este estudio consistió en evaluar las características moleculares de cepas de *E. coli* asociadas a DNT en nuestro país, aisladas de heces de terneros sanos y enfermos a lo largo de Uruguay. Para llevar a cabo esto, se seleccionaron 9 genes que codifican para importantes factores de virulencia (adhesinas y toxinas) de *E. coli* y se analizó la presencia de cada uno de ellos en las cepas de la colección. Se identificó la presencia de todos los genes de virulencia evaluados, con valores de prevalencia variables pero similares a los reportados en Argentina y Brasil. Asimismo, se analizó la diversidad genética de los aislamientos por la técnica de rep-PCR, observándose una alta heterogeneidad de las cepas de *E. coli* de la colección.

INTRODUCCIÓN

La DNT es una importante enfermedad que afecta a terneros en producción y es reconocida como uno de los mayores retos de las industrias ganaderas y lecheras mundialmente (Lorenz et al., 2011). Esta enfermedad, presenta una alta incidencia de morbilidad y mortalidad entre los animales de cría, principalmente en los lugares donde se aplican sistemas intensivos (Bell et al., 2002; Fecteau et al., 2001; Ok et al., 2009). *Escherichia coli* es uno de los agentes infecciosos más comúnmente asociados a la DNT y la identificación de distintos genes de virulencia de este patógeno ha permitido por ejemplo detectar la presencia de distintos patotipos de *E. coli* en los rodeos (Kaper et al., 2004; Nguyen et al., 2010). En Uruguay, trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han permitido detectar la presencia de *E. coli* en casos de DNT. Para la prevención eficiente de la enfermedad, es importante conocer cuáles patógenos se encuentran circulando en nuestro país, y además, caracterizarlos de forma de conocer cuáles son sus características moleculares, su diversidad y

citotoxicidad.

OBJETIVO

El objetivo general de este estudio fue caracterizar molecularmente una colección de aislamientos de *E. coli* provenientes de heces de terneros sanos y enfermos a lo largo de Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se utilizó una colección de 298 aislamientos de *E. coli*, obtenidos de heces de terneros sanos y enfermos de 15 establecimientos ganaderos (11 de lechería, 3 de carne y 1 de cría de terneros machos) de Uruguay en el período 2012 y 2013.

Para la determinación de la presencia de los factores de virulencia se puso a punto la técnica de PCR a tiempo final, utilizando distintos pares de primers (Bertin et al., 1996b, Bertin et al., 1998; Roosendaal et al., 1987) de la bibliografía. Los genes virulencia evaluados fueron los siguientes: *clpG* (subunidad estructural de la adhesina no fimbrial CS31A), *f5* (subunidad estructural de la fimbria F5), *f17A*, *f17G(II)* y *f17G(I)* (subunidad estructural y adhesinas de la F17), *eae* (intimina), *stx1* y *stx2* (toxinas Shiga Tipo 1 y 2) y *sta* y *elt* (toxinas Termo Estable y Termolábil de *E. coli*). Los productos de amplificación de cada muestra se corrieron en geles de Agarosa, se tiñeron con GerRed y se observaron bajo luz UV. Para corroborar la identidad de los productos de amplificación, 1 muestra positiva de cada gen se envió a secuenciar a MACROGEN (Corea).

Para la evaluación de la diversidad intra-específica de la colección de cepas de *E. coli* se utilizó la técnica de rep-PCR, previamente puesta a punto en el laboratorio. Los productos de amplificación se corrieron en geles de Agarosa, se tiñeron con GelRed y se tomaron las imágenes en el scanner FujiFilm Starion FLA 9000 Image Scanner (EquipNet). Los patrones de bandas diferenciales obtenidos se analizaron con el programa bioinformático GelCompar II (Applied Maths, Versión 6.5).

RESULTADOS

Los análisis de la presencia de genes de virulencia demostraron una heterogeneidad en los valores de prevalencia de cada gen. Respecto a las adhesinas fimbriales y afimbriales, *f17A*, el gen que codifica para la subunidad estructural de la fimbria F17, fue el más prevalente (31%)



en la colección, seguido por f17G(II), clpG, f17G(I), eae y f5 (25,8%, 17,5%, 3,7%, 2,0%, 0,7%, respectivamente). Las toxinas presentaron una prevalencia menor, siendo el gen de la toxina termo estable, sta, el de mayor prevalencia (2,0%), seguido por elt y stx1 (1,3% y 1,0% respectivamente) mientras que el gen stx2 no se amplificó en ninguna cepa. En particular, se detectó una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del gen de la adhesina fimbrial F17, f17G(II), y la presencia de DNT (Chi-cuadrado, $p < 0,05$). No fue posible asociar los genotipos obtenidos con los orígenes geográficos o fechas de colecta.

Por otro lado, el análisis de los patrones de fingerprinting obtenidos por rep-PCR mostró una alta heterogenicidad de las cepas de *E. coli* de la colección. No se observó un patrón diferencial entre las cepas de animales enfermos y sanos, ni tampoco un patrón diferencial respecto a la presencia de los genes de virulencia presentes. Sin embargo, se observó la ocurrencia de variantes genéticas iguales en animales sanos y enfermos, demostrando que todas las aislamientos tendrían el potencial de causar DNT.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen el primer reporte de la presencia de genes de virulencia en cepas de *E. coli* aisladas de animales con DNT en Uruguay. En particular, los análisis de prevalencia de los genes de las adhesinas CS31A y F17 coinciden con resultados previos reportados en Francia, Nueva Zelanda, Irán y en países de la región como Argentina y Brasil (Mercado et al., 2003; Ghanbarpour and Oswald, 2009; Andrade et al., 2012; Valat et al., 2014; Al Mawly et al., 2015b). Además, se estableció una asociación entre f17G(II) y la presencia de síntomas de DNT. Esta observación también ha sido previamente establecida, donde además, una presencia importante de la subfamilia II de adhesinas de la fimbria F17, comparada con a la subfamilia I, fue observada (Bertin et al., 1996b; Mainil et al., 2000).

Se espera que una mayor profundización en la caracterización molecular, como el análisis de la presencia de otros factores de virulencia y análisis in vitro de adhesión y citotoxicidad, contribuirá al conocimiento y caracterización de las cepas de transmisión local en nuestro país y proporcionará importante información para resolver un problema de magnitud regional e internacional.

- Al Mawly, J., Grinberg, A., Prattley, D., Moffat, J., Marshall, J., French, N., 2015b. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. *Veterinary Journal* 203,155-160.
- Andrade, G.I., Coura, F.M., Santos, E.L., Ferreira, M.G., Galinari, G.C., Facury Filho, E.J., de Carvalho, A.U., Lage, A.P., Heinemann, M.B., 2012. Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. *Tropical Animal Health Production* 44,1783-1790.
- Bertin, Y., Martin, C., Oswald, E., Girardeau, J.P., 1996b. Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesion genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2921-2928.
- Bertin, Y., Martin, C., Girardeau, J.P., Pohl, P., Contrepois, M., 1998. Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS Microbiology Letters* 162, 235-239.
- Ghanbarpour, R., Oswald, E., 2009. Characteristics and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from septicemic calves in southeast of Iran. *Tropical Animal Health and Production* 41, 109-1099.
- Mainil, J.G., J. Gérardin, J., Jacquemin, E., 2000. Identification of the F17 fimbrial subunit- and adhesin-encoding (f17A and f17G) gene variants in necrotogenic *Escherichia coli* from cattle, pigs and humans 73, 327-335.
- Mercado, E.C., Rodríguez, M., D'Antuono, A.L., Cipolla, A.L., Elizondo, A.M., Rossetti, C.A., Malena, R., Méndez, C.A., 2003. Occurrence and characteristics of CS31A antigen-producing *Escherichia coli* in calves with diarrhoea and septicemia in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine* 50, 8-13.
- Roosendaal, E., Boots, M., de Graaf, F.K., 1987. Two novel genes, fanA and fanB, involved in the biogenesis of K99 fimbriae. *Nucleic Acids Research* 11, 5973-5984.
- Valat, C., Foresta, K., Auvrayb, F., Métayera, V., Méheutb, T., Polizzia, C., Gay, E., Haennia, M., Oswald, E., Madeca, J.Y., 2014. Assessment of adhesins as an indicator of pathovar-associated virulence factors in bovine *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.02365-14.