



IDENTIFICACIÓN DE ESCHERICHIA COLI, ROTAVIRUS Y CORONAVIRUS BOVINO ASOCIADOS A LA DIARREA NEONATAL DE LOS TERNEROS EN URUGUAY

Patricia Acuña^{1*}, Ana Umpiérrez^{2*}, Virginia Bengochea^{3*}, Mabel Berois³, Eduardo Reolon¹, Pablo Zunino²

Las 3 primeras autoras contribuyeron de forma similar con el trabajo

¹Departamento de Investigación y Desarrollo, Laboratorio Santa Elena S.A. ²Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable ³Departamento de Virología, Facultad de Ciencias, Udelar

Resumen

La Diarrea neonatal de los terneros (DNT) es una de las enfermedades más frecuentes, causando pérdidas importantes de morbilidad y mortalidad. Entre los agentes causales más comunes, RVB, CVB y *E.coli* tienen los índices más altos de incidencia a nivel mundial. Nuestro objetivo fue identificar la presencia de *E. coli*, RVB y CVB asociado a las DNT en Uruguay, para conocer su incidencia relativa y profundizar en su caracterización. Se recogieron muestras de heces de 44 terneros con diarrea severa de Florida, Tacuarembó, San José y Colonia. Las muestras fueron procesadas para la identificación de *E. coli*, RVB y CVB. Se identificó la presencia de *E. coli* en 34 muestras, y se generó una colección de 172 cepas y posteriormente se corroborará su identificación fenotípica a nivel molecular. Como agentes virales se detectaron RVB en las muestras positivas a *E. coli* provenientes de Colonia y Tacuarembó. También se identificó CVB en las muestras *E. coli* positivas de Florida. La caracterización de los principales agentes causales de DNT en nuestro país es el primer paso en el desarrollo de vacunas eficaces.

Summary

Neonatal calf diarrhea (NCD) is one of the most frequently reported diseases, causing significant losses for morbidity and mortality. Among the most common causative agents, Bovine Rotavirus (RVB), Bovine Coronavirus (CVB) and *Escherichia coli* (*E. coli*) have the highest incidence worldwide. Our objective was to identify the presence of *E. coli*, RVB and CVB associated to NCD in Uruguay to know their relative incidence and deepen their characterization.

Stool samples were collected from 44 calves with severe diarrhea from Florida, Tacuarembó, San Jose and Colonia. The samples were processed for identification of *E. coli*, RVB and CVB. We identified the presence of *E. coli* in 34 samples and it was generated a collection of 172 strains. It is intended to molecularly corroborate the phenotypic identification. As viral agents, there were detected RVB in *E. coli* positive samples of Colonia and Tacuarembó. It was also identified CVB in *E. coli* positive samples of Florida. The characterization of the main causative agents of NCD in our country is the first step in the design and development of effective vaccines.

Introducción

La DNT es una de las enfermedades más reportadas, provocando importantes pérdidas por morbilidad y mortalidad. Dentro de los posibles agentes causantes de

diarrea neonatal bovina RVB, CVB y *E.coli* son los de mayor incidencia a nivel mundial. En Uruguay no poseemos datos concretos del impacto de esta enfermedad, así como tampoco se han estudiado los agentes de mayor incidencia. Por tanto, este estudio pretende ser un primer abordaje al conocimiento de los patógenos causales de DNT, conocer su incidencia relativa y profundizar en su caracterización para diseñar estrategias efectivas de vacunación.

Objetivo

Identificar la presencia de *E. coli*, RVB y CVB asociados a DNT en Uruguay.

Materiales y métodos

Se colectaron muestras de heces de 44 terneros con diarrea, menores de 35 días de edad, provenientes de establecimientos ganaderos de los Departamentos de Florida, Tacuarembó, San José y Colonia.

Las muestras fueron colectadas y enviadas refrigeradas al Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, donde fueron procesadas para identificación de *E. coli* y al Departamento de Virología de la Facultad de Ciencias, donde fueron procesadas para identificación de RVB y CVB.

Para la identificación de *E. coli*, las muestras se sembraron en medio selectivo Mac Conkey durante 24 ± 2 hs a 37°C y luego se seleccionaron hasta 5 colonias lactosa positivas de cada una de las muestras. Cada muestra que presentó colonias Lactosa positivas, sospechosas de *E. coli*, se almacenó por duplicado a -20°C y -80°C en medio de crecimiento. A continuación se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación fenotípica de *E. coli* (prueba de Indol, Voges-Proskauer, fermentación de la Glucosa, Catalasa, Oxidasa, Citrato, crecimiento y producción de gas en medio EC a 45 ± 2 hs) así como tinción de Gram.

Para la identificación de RVB se utilizó la técnica RT-PCR Heminested Multiplex (Gentsch et. al., 1992). Esta técnica amplifica en un primer paso de RT-PCR con oligonucleótidos correspondientes a regiones conservadas. En una reacción posterior de PCR Heminested Multiplex, utilizando un pool de primers, se clasifican según el peso molecular del fragmento amplificado.

Para la identificación de CVB se realizó la RT-nested PCR (Brandao, 2003).

Resultados

Todos los animales muestreados (n=44) presentaban diarrea con sintomatología grave (síntomas de los animales y aspecto de las muestras), de acuerdo a lo reportado por los productores.

En todos los establecimientos que participaron del ensayo se identificaron animales (n=34) cuyas muestras de heces presentaban colonias lactosa positivas (Tabla 1), aislándose finalmente un total de 172 aislamientos sospechosos de *E. coli*. Asimismo, todas las cepas presentaron una morfología de bastones y fueron Gram negativas. De la misma manera, los resultados de las pruebas bioquímicas demostraron que un total de 152 cepas presentaron todas las características típicas de *E. coli*: Indol negativo, Catalasa, positiva, Oxidasa negativa, Voges-Proskauer negativo, Citrato negativo y crecimiento con producción de gas en medio EC a 45°C.

Se identificó la presencia de RVB en los brotes correspondientes a los Departamentos de Colonia y Tacuarembó. Asimismo se identificó la presencia de CVB en el brote correspondiente al Departamento de Florida (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados obtenidos para la identificación de los agentes estudiadas

Origen	NºBrotos	NºAnimales	Nº Animales sospechosos positivos a los agentes estudiados		
			Totales	E. coli	RVB
Colonia	2	15	6	6	-
Florida	2	11	11	-	11
San José	1	10	10	-	-
Tacuarembó	1	7	7	7	-

Discusión/conclusión/perspectivas

Se identificó la presencia de *E. coli* en 34 muestras de heces de terneros menores de 40 días que presentaban diarrea grave, provenientes de diferentes regiones de nuestro país. A partir de dichas muestras se generó una colección de 172 cepas de *E. coli*. Si bien los resultados de las pruebas bioquímicas indican que 20 de ellas no presentaban alguna de las características de la especie bacteriana buscada es posible que las cepas difieran en alguna de sus propiedades bioquímicas. Por ello, se pretende amplificar el gen que codifica para el ARNr 16S

por PCR en todos los aislamientos y corroborar molecularmente la identificación fenotípica de *E. coli*.

Asimismo se evaluará la presencia de genes asociados a virulencia por PCR utilizando primers específicos. En particular, se buscará la presencia de los genes que codifican para la fimbria 17 y el antígeno de superficie CS31A, ambos asociados mundialmente con cepas diarreicas de *E. coli* en terneros (C. Martin, 1991). La presencia de dichos genes y la subsiguiente evaluación de su expresión por Microscopía Electrónica de Barrido nos permitirá caracterizar por primera vez cepas de *E. coli* asociadas a DNT en nuestro país.

En cuanto a los agentes virales, se detectó RVB en los brotes correspondientes al Departamento de Colonia y Tacuarembó, como continuación de un estudio realizado por equipo de Virología de la Facultad de Ciencias y Laboratorios Santa Elena S.A., el cual se detectó por primera vez en el país la circulación de cepas de RVB (Bengochea y otros, 2011). Asimismo, se identificó la presencia de CVB en los brotes del Departamento de Florida lo cual constituye un primer relevamiento epidemiológico en establecimientos nacionales.

Posteriormente se realizará la caracterización molecular de las cepas identificadas.

La presencia de RVB y/o CVB en las muestras positivas a *E.coli* nos brinda evidencia de infecciones mixtas. La caracterización de los agentes causantes de DNT en nuestro país es el primer paso para la elaboración de vacunas efectivas.

Referencias bibliográficas

Bengochea, V.; Alberti, A.; Escobar, R.; Reolon, E.; Arbiza, J.; Berois, M. (2011). Epidemiología Molecular de Diarreas Bovinas de Etiología Viral en Uruguay. Poster presentado en el X Congreso Argentino de Virología, (pág. Poster). Buenos Aires, Argentina.

Brandao, P.E., et al. (2003). Nested PCR assay for detection of bovine coronavirus S1 gene. *BARq. Inst. Biol.* 70(1), 1-3.

C. Martin, C. Boeuf, F. Bousquet. (1991). *Escherichia coli* CS31 A fimbriae : molecular cloning, expression and homology with the K88 determinant. *Microbial Pathogenesis.* 10, 429-442.

Gentsch J. R.; Glass, R.I.; Woods, P.; Gouvea, V.; Gorziglia, M.; Flores, J.; Das, B. K.; Bhan, M.K. (1992). Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol* 30, 1365-1373.