

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
tese será disponibilizado  
somente a partir de 06/1/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Etiologia microbiana de infecções umbilicais em bezerros e  
fatores de virulência extraentéricos em isolados de *Escherichia  
coli***

LORRAYNE DE SOUZA ARAÚJO MARTINS

BOTUCATU, SP

Maio, 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Etiologia microbiana de infecções umbilicais em bezerros e  
fatores de virulência extraentéricos em isolados de *Escherichia  
coli***

LORRAYNE DE SOUZA ARAÚJO MARTINS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária como requisito para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Associado Márcio Garcia Ribeiro.

Área de concentração: Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar.

BOTUCATU, SP

Maio, 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Martins, Lorryne de Souza Araújo.

Etiologia microbiana de infecções umbilicais em bezerros e fatores de virulência extraentéricos em isolados de *Escherichia coli* / Lorryne de Souza Araújo Martins. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50500007

1. Bezerro - Doenças. 2. Umbigo - Infecções. 3. *Escherichia coli*. 4. Anti-infecciosos. 5. Fatores de virulência.

Palavras-chave: Genes ExPEC; MALDI-TOF MS; Multirresistência aos antimicrobianos; Onfalopatias infecciosas em bezerros.

## **Lorryne de Souza Araújo Martins**

Etiologia microbiana de infecções umbilicais em bezerros e fatores de virulência extraentéricos em isolados de *Escherichia coli*

### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Associado Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ - UNESP, Botucatu, SP

Prof. Titular Alexandre Secorun Borges

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ - UNESP, Botucatu, SP

Prof. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ - UNESP, Botucatu, SP

Prof. Dr. Rogério Giuffrida

Membro

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista

Unoeste, Presidente Prudente, SP

Prof. Dra. Thaís Helena Constantino Patelli

Membro

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Norte do Paraná –

UENP, Bandeirantes, PR

Data da defesa: 06 de maio de 2022.

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos meus pais Vilma de Souza Araújo e Gesmar Martins Sobrinho, que me apoiaram e contribuíram para que meu sonho tornasse real.*

*Também dedico este trabalho ao meu companheiro de vida Rodrigo Garcia Motta, que sempre foi o meu exemplo de pessoa e profissional, fazendo com que o caminho percorrido até aqui fosse mais leve.*

## AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, que sem Ele nada seria possível.

Ao meu orientador, Márcio Garcia Ribeiro, pelo auxílio, paciência, dedicação e disponibilidade para elaboração deste trabalho, partilhando seu conhecimento e experiência ao longo destes 4 anos de orientação. Obrigada por acreditar no meu potencial e na confiança depositada.

A todos os amigos e companheiros de laboratório, em especial ao Fábio Vinicius, Beatriz Oliveira e André Mota. Tenho certeza de que, sem cada um de vocês eu não teria chegado até aqui. Gratidão!

Ao Fernando José Paganini Listoni, além de técnico de laboratório, na maioria das vezes uma figura paterna, muito obrigada por ser uma inspiração para todos nós e por nos mostrar que sempre podemos ir além. Agradeço por todo conhecimento compartilhado e por todos os “puxões de orelha”, que contribuíram para o meu amadurecimento não só como profissional, mas para a vida!

Aos servidores e docentes do Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ/UNESP, Botucatu, SP

Aos colegas responsáveis pelos laboratórios e serviços colaboradores desta pesquisa, professores Antônio Campanha Martinez, Rodrigo Hernandez e Sandra Bosco. E aos pós-graduandos Alana Lucena e Henrique Orsi, pela dedicação e auxílio em todas as etapas do projeto.

A todos os servidores do Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP, Botucatu, SP, e do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária por darem suporte à pesquisa e pela oportunidade de aprendizado ao longo destes anos.

E, mais uma vez, demonstro toda a minha gratidão ao meu querido companheiro, Rodrigo G. Motta, pela participação ativa em cada etapa deste projeto. Obrigada por ser meu porto seguro!

E aqueles que não citei o nome, mas de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente nessa jornada, meu muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você fará o impossível!*

*São Francisco de Assis*



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µL	Microlitros
µM	Micrômetro
<i>afa</i>	Gene codificador de adesinas não fimbriais
<i>arpA</i>	Gene utilizado para classificação filogenética de <i>E. coli</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
<i>chuA</i>	Gene utilizado para classificação filogenética de <i>E. coli</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetro
<i>cnf</i>	Gene codificador do fator citotóxico necrosante
CNF	Fator Necrosante Citotóxico
<i>csgA</i>	Proteína constituinte de Curli
<i>csgB</i>	Proteína constituinte de Curli
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eae</i>	Gene codificador de <i>Escherichia coli attachment and effacing</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EPM	Escola Paulista de Medicina
et al.	Colaboradores
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extra-entérica
<i>fim</i>	Gene codificador de fímbria
FimF	Componente fimbrial minoritário de fímbria F
FimG	Componente fimbrial minoritário de fímbria G
FimH	Componente fimbrial minoritário de fímbria H
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
H	Horas
<i>hly</i>	Gene codificador de hemolisina
<i>ibe</i>	Gene codificador de invasina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>ijaA</i>	Gene utilizado para classificação filogenética de <i>E. coli</i>
<i>ireA</i>	Gene codificador de sideróforo
<i>iroN</i>	Gene codificador de sideróforo
<i>irp 2</i>	Gene codificador de <i>yersin bactin</i>
<i>iss</i>	Gene codificador de resistência ao soro
<i>iucD</i>	Gene codificador de sideróforo
<i>iutA</i>	Gene codificador de aerobactina
<i>kpsMTII</i>	Gene codificador de cápsula do grupo II
LPS	Lipopolissacarídeo
mcg	Microgramas
MILi	Motilidade, indol e lisina
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimol
nº	Número
NMEC	<i>Neonatal meningitis caused by E. coli</i>
°C	Graus Celsius
<i>ompA</i>	Gene codificador de invasina
<i>pap</i>	Gene codificador da fímbria P
<i>pap C</i>	Gene codificador da subunidade C da fímbria P
<i>pap G</i>	Gene codificador da subunidade G da fímbria P

<i>sfa</i>	Gene codificador de fímbria S
SfaA	Proteína majoritária da fímbria S
SfaG	Proteína componente da fímbria S
SfaH	Proteína componente da fímbria S
SfaS	Proteína componente da fímbria S
<i>sitA</i>	Gene codificador de sideróforo
ST	Enterotoxina termoestável
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora da toxina de Shiga
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica

## SUMÁRIO

RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	13
CAPÍTULO 1 .....	15
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Aspectos da bovinocultura e da criação de bezerros.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Infecções umbilicais em bezerros.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.1 Aspectos anatomopatológicos do umbigo dos bezerros .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.2 Etiologia das infecções umbilicais em bezerros .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.3 Epidemiologia e fisiopatogenia .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.4 Sinais clínicos.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.5 Diagnóstico .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.6 Tratamento e prognóstico.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.7 Medidas gerais de controle e profilaxia .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 <i>E. coli</i>: propriedades gerais.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.1 Classificação filogenética .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.2 Patotipos DEC.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.3 ExPEC.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.4 Fatores de colonização .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.5 Mecanismo de captação de ferro (sideróforos).....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.6 Endotoxinas .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3.7 Exotoxinas .....</b>	<b>27</b>
<b>2.4 Resistência de <i>E. coli</i> aos antimicrobianos.....</b>	<b>29</b>
CAPÍTULO 2 .....	31
<b>ARTIGO 1 .....</b>	<b>32</b>
<b>ARTIGO 2 .....</b>	<b>48</b>
CONCLUSÃO GERAL .....	70
REFERÊNCIA GERAL .....	71
ANEXOS .....	77

MARTINS, L. S. A. **Etiologia microbiana de infecções umbilicais em bezerros e fatores de virulência extraentéricos em isolados de *Escherichia coli***. Botucatu, 2022. 78p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

## RESUMO

As infecções umbilicais em bezerros apresentam etiologia complexa e representam uma das principais causas de prejuízos ao produtor decorrentes de complicações como poliartrite, pneumonia, abscessos em órgãos, septicemia e consequente alta mortalidade neonatal, descarte prematuro e reposição de animais. Número restrito de estudos tem investigado a complexidade etiológica das infecções umbilicais em bezerros com base no diagnóstico molecular e a multirresistência dos isolados aos antimicrobianos, tampouco o perfil de genes extraentéricos (ExPEC) de *Escherichia coli* associados a virulência do patógeno nas onfalopatias de origem infecciosa. Foram colhidas 150 amostras umbilicais de bezerros (idade média de 9,4 dias) de 27 propriedades leiteiras de quatro estados do Brasil. As infecções umbilicais foram classificadas clinicamente em escores grau 1 (leve), 2 (moderada) e 3 (grave). Todas as secreções umbilicais foram submetidas ao cultivo microbiológico, teste de sensibilidade microbiana *in vitro* dos isolados e diagnóstico dos micro-organismos, em nível de espécie, por espectrometria de massas (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry* - MALDI-TOF MS). Os isolados de *E. coli* foram submetidos ao diagnóstico de 16 genes relacionados a fatores de virulência (FV) ExPEC, a saber: fímbrias/adensinas (*sfaDEa*, *papA*, *papC*, *afaBC*), toxinas (*hlyA*, *sat*, *cnf1*, *cdt*), sideróforos (*iroN*, *irp2*, *iucD*, *ireA*), invasinas (*ibeA*) e mecanismos de resistência ao soro (*ompT*, *traT*, *kpsMTII*). Foram isoladas 231 linhagens de micro-organismos, das quais 82,3% (190/231) de origem bacteriana e 17,7% (41/231) fungos e leveduras. Os principais grupos/gêneros de patógenos foram enterobactérias (105/190=55,3%), estafilococos (19/190=10%), *Pseudomonas* spp. (13/190=6,8%), *Enterococcus* spp. (8/190=4,2%), estreptococos (7/190=3,7%) e actinomicetos (7/190=3,7%). *Aspergillus fumigatus* (15/41=36,6%), *Aspergillus niger* (10/41=24,4%) e *Aspergillus terreus* (8/41=19,5%) foram os fungos mais frequentes. *E. coli* (27/72=37,5%), *Staphylococcus sciuri* (4/72=5,5%) e *Enterobacter xiangfangensis* (3/72=4,2%) foram os principais micro-organismos isolados em cultura pura, enquanto *Aerococcus viridans* + *Candida catenulata* (2/72=2,9%); *Escherichia coli* + *Aspergillus fumigatus* (2/72=2,9%); *Escherichia coli* + *Aspergillus terreus* (2/72=2,9%); *Escherichia coli* + *Proteus vulgaris* (2/72=2,9%) foram as principais associações de agentes. Marbofloxacino (128/190=67,4%), amoxicilina/ácido clavulânico (121/190=63,7%) e gentamicina (112/190=58,9%) foram os antimicrobianos mais efetivos. Em contraste, os isolados apresentaram maior resistência para sulfametoxazol/trimetoprim (159/190=83,7%), ampicilina (114/190=60%) e tetraciclina (101/190=53,1%). Resistência simultânea  $\geq 3$  classes de antimicrobianos foi identificada em 83,7% (159/190) dos isolados. Os escores de gravidade clínica das infecções umbilicais graus 1, 2 e 3 foram identificados em 34% (51/150), 34% (51/150) e 32% (48/150) dos animais, respectivamente. Nos bezerros com isolamento de *E. coli*, foram identificados escores de gravidade 1, 2 e 3 em, respectivamente, 32,2% (19/59), 23,7% (14/59) e 44,1% (26/59) animais. Foi possível obter informações de complicações relacionadas as infecções umbilicais de 21 animais até idade da desmama (45 dias, em média), dos quais 9,5% (2/21) desenvolveram emagrecimento progressivo, 19,1% (4/21) poliartrite e 28,6% (6/21) evoluíram para óbito. Os principais genes codificadores de FV detectados nos isolados de *E. coli* foram resistência ao soro (*traT*, 42/59=72,2%; *ompT*, 35/59=59,3%, *kpsMTII* 10/59=17%), invasinas (*ibeA* 11/59=18,6%), fímbrias/adensinas (*papA*, 8/59 = 13,6%; *papC* 15/59 = 9,59%) e sideróforos (*iroN* 8/59 = 13,6%; *iucD* 9/59 = 15,3%). A associação entre os genes *ompT* e *traT* foi a mais frequente nos animais

com escores de gravidade 1 (4/17=23,5%) e 2 (2/14=14,3%), enquanto *iroN* e *traT* (2/25=8%), e *ibeA*, *ompT* e *traT* (2/25=8%) foram frequentes em casos de gravidade 3. Não houve diferença estatística ( $p=0,062$ ) entre a detecção dos diferentes genes ExPEC e os escores de gravidade clínica dos casos. Infere-se a elevada complexidade etiológica nas onfalopatias de origem infecciosa em bezerros, a multirresistência dos isolados aos antimicrobianos convencionais e complicações clínicas secundárias às infecções umbilicais, com alta mortalidade (28,6%); reforçando a importância da antissepsia umbilical nos primeiros dias após o nascimento dos bezerros, bem como o uso racional de antimicrobianos no tratamento dos casos. A detecção de genes ExPEC e associação com escores de gravidade clínica dos casos foi investigada pela primeira vez em bezerros com infecções umbilicais. A elevada identificação de *traT* (72,2%) e *ompT* (59,3%) indica que estes genes relacionados a resistência ao soro possam ser utilizados como biomarcadores de gravidade das infecções umbilicais em bezerros neonatos. Os resultados do presente estudo contribuem com a caracterização etiológica, da resistência múltipla dos isolados aos antimicrobianos e a presença de genes extraentéricos relacionados a virulência de *E. coli*, em bezerros com infecções umbilicais.

**Palavras-chave:** Onfalopatias infecciosas em bezerros, genes ExPEC, multirresistência aos antimicrobianos, MALDI-TOF MS.

MARTINS, L. S. A. **Microbial etiology of umbilical infections in calves and virulence-associate factors of extraintestinal *Escherichia coli***. Botucatu, 2022. 78p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

## ABSTRACT

Umbilical infections in calves are characterized by the high complexity of etiology and represent one of the main causes of losses to dairy farmers due to the development of complications, e.g., polyarthritis, pneumonia, organ abscesses related to secondary premature disposal, animal replacement, and high neonatal mortality. A restrict number of studies have investigated the etiology of the disease based on molecular methods, the multidrug resistance of isolates to conventional antimicrobials, as well as the presence of extraintestinal *Escherichia coli* (ExPEC) genes related to the virulence of the pathogen. A total of 150 specimens of umbilical infections in calves were collected (mean age of 9.4 days) from 27 dairy farms of the four states from Brazil. Umbilical infections were clinically classified as scores 1 (mild), 2 (moderate), and 3 (severe). All the specimens were subjected for microbiological culture, *in vitro* antimicrobial susceptibility test of the isolates, and diagnosis of microorganisms at the species level based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-*Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS). All *E. coli* isolates were submitted to molecular diagnosis of 16 extraintestinal virulence-associated genes, as follow: fimbriae/adhesin (*sfaDEa*, *papA*, *papC*, *afaBC*), toxins (*hlyA*, *sat*, *cnf1*, *cdt*), siderophores (*iroN*, *irp2*, *iucD*, *ireA*), invasins (*ibeA*), and mechanisms of serum resistance (*ompT*, *traT*, *kpsMTII*). Two hundred and thirty microorganisms were isolated, of which 82.6% (190/230) were from bacterial origin and 17.7% (41/231) fungi or yeasts. Enterobacteria (105/190=55.3%), staphylococci (19/190=10%), *Pseudomonas* spp. (13/190=6.8%), *Enterococcus* spp. (8/190=4.2%), streptococci (7/190=3.7%), and actinomycetes (7/190=3.7%) were the main groups/genus of the pathogens identified. *Aspergillus fumigatus* (15/41=36.6%), *Aspergillus niger* (10/41=24.4%) and *Aspergillus terreus* (8/41=19.5%) were the most frequent fungi. *E. coli* (27/72=37.5%), *Staphylococcus sciuri* (4/72=5.5%) and *Enterobacter xiangfangensis* (3/72=4.2%) were the main microorganisms identified in pure culture, whereas *Aerococcus viridans* + *Candida catenulata* (2/72=2.9%); *Escherichia coli* + *Aspergillus fumigatus* (2/72=2.9%); *Escherichia coli* + *Aspergillus terreus* (2/72=2.9%); *Escherichia coli* + *Proteus vulgaris* (2/72=2.9%) in coinfections. Marbofloxacin (128/190=67.4%), amoxicillin/clavulanic acid (121/190=63.7%), and gentamicin (112/190=58.9%) were the most effective antimicrobials. Conversely, the isolates showed higher resistance to sulfamethoxazole/trimethoprim (159/190=83.7%), ampicillin (114/190=60%), and tetracycline (101/151=53.1%). Among the isolates studied, 83.7% (159/190) showed simultaneous resistance  $\geq 3$  groups of antimicrobials (multidrug-resistant). Clinical severity scores 1, 2, and 3 of all umbilical infections were identified in 34% (51/150), 34% (51/150), and 32% (48/150) of the animals, respectively. Particularly with *E. coli* isolation, clinical gravity scores 1, 2, and 3 were observed in 32.2% (19/59), 23.7% (14/59), and 44.1% (26/59) animals, respectively. Clinical complications secondary to umbilical infections were available in 21 calves (~45 days), of which 9.5% (2/21) developed progressive weight loss, 19.1% (4/21) polyarthritis, and 28.6% (6/21) died. The main virulence-associated genes encoded were serum resistance (*traT*, 42/59=72.2%; *ompT*, 35/59=59.3%, *kpsMTII*, 10/59=17%), invasins (*ibeA*, 11/59=18.6%), adhesins (*papA*, 8/59=13.6%; *papC*, 15/59=9.59%), and siderophores (*iroN*, 8/59=13.6%; *iucD*, 9/59=15, 3%). The main associations of genes were found between *ompT* and *traT* among calves with severity 1 (4/17=23.5%) and 2 (2/14=14.3%), whereas *iroN* and *traT* (2/25=8%), and *ibeA*, *ompT* and *traT* co-occurrence (2/25=8%) were the most common in cases score 3. Nonetheless, no significance difference ( $p=0.062$ ) was observed between the ExPEC genes identification and the clinical

severity scores of the cases. Here, a high etiological complexity of agents related to umbilical infections in calves, the multidrug resistance of isolates, in addition to clinical complications, *i.e.*, high mortality rates (28.6%), highlight the need for umbilical antisepsis of neonatal calves and rational use of antimicrobials in therapeutic approaches. Furthermore, the virulence associated ExPEC genes were investigated for the first time among calves, where scores of clinical severities of umbilical infections were assessed. The high prevalence of *traT* (72,2%) and *ompT* (59,3%) indicates that these serum resistance-related genes could be used as biomarkers to further studies of ExPEC for umbilical infections of neonatal calves. Results of this study contribute to the etiological characterization, antimicrobial resistance pattern, and virulence mechanisms of ExPEC involved in umbilical infections of calves.

**Keywords:** Infectious omphalopathies in calves, ExPEC genes, multidrug-resistance pattern, MALDI-TOF MS

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**



## 1 1 INTRODUÇÃO

2 Os primeiros meses de idade são considerados críticos na criação de bezerros,  
3 devido a certa imaturidade do sistema imunológico, que favorece o desenvolvimento de  
4 infecções entéricas, pulmonares, articulares e umbilicais (GOMES, 2021).

5 As infecções umbilicais representam entre 28 e 42% das afecções clínicas em  
6 bezerros com até 30 dias de idade destinados a produção de leite, e correspondem  
7 aproximadamente 10% de todas as causas de mortalidade em animais com até oito  
8 meses de idade, causando grande prejuízo aos produtores com a mortalidade neonatal,  
9 descarte precoce e reposição de animais (REIS et al., 2009, WINDEYER et al., 2014,  
10 FARADONBEH e FARADONBEH., 2016).

11 As onfalopatias de origem infecciosa em bezerros apresentam etiologia  
12 complexa, principalmente de origem bacteriana, com predomínio de enterobactérias,  
13 estafilococos, estreptococos e certos actinomicetos (RENGIFO et al., 2006, CARDONA  
14 et al. 2011).

15 As infecções umbilicais ocorrem por via ascendente, pelo contato do resquício  
16 do cordão umbilical com sujidades, matéria orgânica, solo, fezes e utensílios de uso  
17 comum (GOMES, 2021). Os patógenos que se estabelecem nas infecções primárias na  
18 região umbilical podem ser disseminados para outros órgãos, causando abscessos,  
19 pneumonia, poliartrite e sepse, com prognóstico reservado, e alta mortalidade neonatal  
20 (WINDEYER et al., 2014).

21 Os principais fatores de risco para o desenvolvimento das infecções umbilicais  
22 em bezerros estão relacionados às práticas deficientes de antisepsia do umbigo nos  
23 primeiros dias de vida dos neonatos, animais que não ingeriram adequadamente o  
24 colostro nas primeiras horas de vida e excesso de matéria orgânica e fezes no ambiente  
25 da maternidade e bezerreiros (RENGIFO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2010).

26 *Escherichia coli* (*E. coli*) é a enterobactéria mais frequentemente isolada de  
27 infecções umbilicais em bezerros (CARDONA et al., 2011). Este micro-organismo  
28 pertence a microbiota fecal de animais e humanos, além de estar amplamente  
29 distribuído no ambiente de criação dos animais, permanecendo viável por vários meses  
30 na matéria orgânica e fezes (GHARIEB et al., 2019).

31 *E. coli* se caracteriza pelo comportamento oportunista e elevada complexidade  
32 de fatores de virulência (FV), intrínsecos (lipopolissacarídeos presentes na estrutura da  
33 parede celular bacteriana) e extrínsecos (citotoxinas, adesinas, mecanismos de  
34 captação de ferro, invasinas, resistência ao soro). Ainda, se notabiliza pela elevada

35 resistência aos antimicrobianos, convencionalmente utilizados no tratamento das  
36 infecções em ruminantes (RENGIFO et al., 2006).

37 Com base em FV específicos, capacidade de invasão celular e em certas  
38 manifestações clínicas dos hospedeiros, *E. coli* pode ser classificada em entérica,  
39 intestinais ou diarreio gênicas (diarreio genic *E. coli* - DEC) e extraentéricas ou  
40 extraintestinais (extraintestinal pathogenic *E. coli* - ExPEC). Isolados de DEC  
41 provenientes de infecções em humanos e animais apresentam certo padrão de FV e são  
42 classificados em diferentes patótipos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica  
43 (EPEC), enteroinvasora (EIEC), produtoras da toxina de Shiga (STEC),  
44 enteroagregativa (EAEC) e de aderência difusa (DAEC) (CROXEN; FINLAY, 2010).

45 ExPEC são encontradas causando ampla variedade de afecções em animais  
46 domésticos e humanos, particularmente, infecções umbilicais, pulmonares,  
47 geniturinárias, neurológicas e dermatológicas (MANGES; JOHNSON, 2015). No  
48 entanto, de maneira similar às infecções mamárias clínicas em vacas por *E. coli*, não  
49 está completamente esclarecido o perfil dos genes de FV (GUERRA et al., 2020),  
50 tampouco a gravidade clínica relacionadas às infecções umbilicais em bezerros (VAN  
51 BOST; MAINIL, 2003).

52 Neste cenário, o presente estudo investigou a caracterização de espécies de  
53 micro-organismos por espectrometria de massas (MALDI-TOF/MS) envolvidos em  
54 infecções umbilicais em 150 bezerros, os escores de gravidade clínica das onfalopatias,  
55 a resistência múltipla dos isolados aos antimicrobianos, bem com a presença de 16  
56 genes relacionados a infecções extraentéricas em isolados de *E. coli* obtidos de  
57 onfalopatias de origem infecciosa.

## 58 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### 59 **2.1 Aspectos da bovinocultura e da criação de bezerros**

60 A bovinocultura é uma das principais atividades do agronegócio em todo mundo.  
61 O Brasil possui um dos maiores rebanhos comerciais do mundo, estimado em 214,8  
62 milhões de bovinos. Dados oficiais remetem, exclusivamente à pecuária, a  
63 movimentação de R\$ 192,24 bilhões em 2019 (IBGE, 2020).

64 O crescimento da atividade pode ser balizado no número de bezerros nascidos,  
65 bem como pela qualidade dos animais no momento da desmana, posto que esta  
66 categoria será responsável pela futura manutenção da cadeia produtiva de carne ou  
67 leite nas propriedades rurais. Neste contexto, é oportuno enaltecer que são

68 desmamados, em média, cerca de 44 milhões de bezerros por ano no país (BRASIL,  
69 2019).

70 A fase de cria, popularmente chamada de criação de bezerros, ocupa posição  
71 de destaque. O manejo neonatal dos animais impacta diretamente sobre toda vida  
72 produtiva e reprodutiva (BEAM et al., 2009, GOMES, 2021). Dessa forma, as  
73 enfermidades que acometem os bezerros recém-nascidos, incluindo as onfalopatias,  
74 são de grande impacto, posto que causam prejuízos econômicos de grande ordem,  
75 decorrentes da elevada morbimortalidade, custos com tratamentos e assistência  
76 veterinária, baixo desempenho zootécnico e aumento nas taxas de reposição de animais  
77 (RODRIGUES et al., 2010; WINDEYER et al., 2014).

## 78 **2.2 Infecções umbilicais em bezerros**

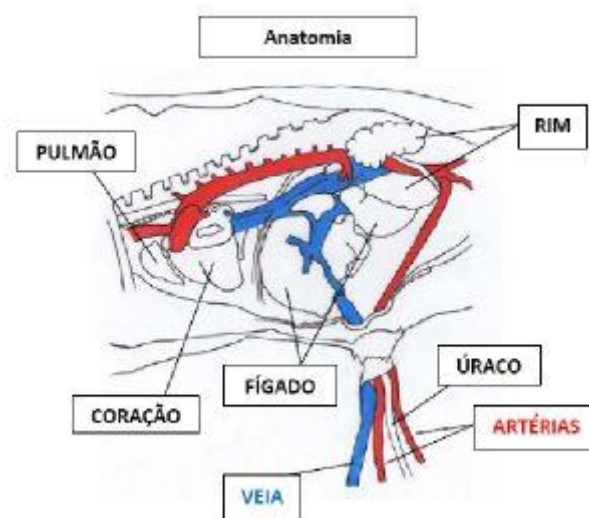
79 As doenças neonatais em bovinos são multifatoriais e estão relacionadas a  
80 interação entre patógenos, deficiências higiênico-sanitárias na maternidade, deficiente  
81 ingestão de colostro e, especialmente, a ineficácia no procedimento de antissepsia  
82 umbilical dos bezerros nos primeiros dias de vida (RENGIFO et al., 2006; GOMES,  
83 2021).

84 O fornecimento de colostro de qualidade e em quantidade adequadas, nas  
85 primeiras seis horas de vida, é crucial para o estabelecimento da imunidade em bezerros  
86 e tem relação direta com a taxa de mortalidade até o momento do desmame. A ingestão  
87 do colostro supre a demanda energética, além de ser responsável pela transferência de  
88 imunidade passiva (imunoglobulinas, leucócitos e citocinas) necessários para o bom  
89 desenvolvimento do recém-nascido (BEAM et al., 2009, BENESI et al., 2012).  
90 Deficiências na transferência da imunidade passiva em bovinos têm sido diretamente  
91 relacionadas a enfermidades infecciosas nos neonatos, particularmente onfalopatias,  
92 diarreias, broncopneumonias e septicemias (BENESI et al., 2012).

93 As infecções umbilicais representam entre 28% e 42,2% das afecções clínicas  
94 em bezerros com até 30 dias de idade, e correspondem a 10% da mortalidade até os  
95 oito meses de idade (REIS et al., 2009, WINDEYER et al., 2014, FARADONBEH e  
96 FARADONBEH., 2016). As onfalopatias de origem infecciosa causam perdas  
97 econômicas significativas nos diferentes sistemas de produção, devido ao aumento da  
98 mortalidade dos bezerros, gastos com reposição de animais, tratamentos e honorários  
99 veterinários (RODRIGUES et al., 2010; GOMES, 2021).

### 100 2.2.1 Aspectos anatomopatológicos do umbigo dos bezerros

101 O cordão umbilical ou o umbigo é uma estrutura complexa, responsável pela  
 102 comunicação materno-fetal durante a vida intrauterina. É constituído por quatro  
 103 estruturas, a saber: duas artérias, projetadas na porção caudal, que se comunicam  
 104 diretamente com as artérias ilíacas. Após o parto, estas estruturas se tornaram os  
 105 ligamentos redondos da bexiga. Possui também uma veia localizada na região cranial,  
 106 que se comunica diretamente com o fígado. Após o nascimento do bezerro, esta veia  
 107 se tornará o ligamento redondo do fígado. Ainda, a estrutura umbilical possui o úraco,  
 108 que está conectado diretamente à vesícula urinária (GOMES, 2021).



109  
 110 Fonte: <https://rehagro.com.br/blog/cuidados-com-vacas-e-bezerros/>

111 **Figura 1.** Estrutura anatômica do umbigo

### 112 2.2.2 Etiologia das infecções umbilicais em bezerros

113 As onfalopatias em bezerros representam processos inflamatórios, infecciosos  
 114 ou malformações de qualquer estrutura umbilical. Esta afecção possui como fatores  
 115 predisponentes, ambientes com excesso de matéria orgânica, deficiências de  
 116 procedimentos higiênico-sanitários na maternidade, traumatismos, partos distócicos e  
 117 malformações congênitas (GOMES, 2021).

118 As onfalopatias infecciosas podem evoluir para a disseminação de micro-  
 119 organismos pelos vasos umbilicais ou pelo úraco desenvolvendo infecções articulares,  
 120 meningite, uveíte, abscessos em órgãos, pneumonia, endocardite e septicemia  
 121 (RENGIFO et al., 2006, BEAM et al., 2009).

122 As onfalopatias não infecciosas são representadas principalmente por hérnias,  
 123 malformações e síndrome do úraco persistente, enquanto as de origem infecciosa por  
 124 onfalites, onfaloflebites, onfaloarterites, onfaloartrites e onfalouraquites, das quais as

125 causas infecciosas são as mais frequentes. Após o nascimento do bezerro, o cordão  
126 umbilical fica exposto, propiciando a invasão de patógenos por via ascendente,  
127 presentes na microbiota da pele, fezes e matéria orgânica do próprio ambiente dos  
128 criatórios (BENESI et al., 2012).

129 Grande complexidade de patógenos já foram identificados em casos de  
130 infecções umbilicais em bezerros, especialmente enterobactérias (*E. coli*, *Enterobacter*  
131 spp., *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp), estafilococos, estreptococos, *Pseudomonas*  
132 *aeruginosa* e actinomicetos (*Nocardia* spp. e *Trueperella pyogenes*). Entretanto, nestes  
133 estudos, o diagnóstico dos agentes tem sido baseado majoritariamente na identificação  
134 fenotípica dos micro-organismos (RENGIFO et al. 2006; CARDONA et al., 2011).

### 135 **2.2.3 Epidemiologia e fisiopatogenia**

136 As onfalopatias infecciosas em bezerros são frequentemente diagnosticadas em  
137 animais durante as primeiras quatro semanas de vida, estando relacionadas com a  
138 intensidade de contaminação do ambiente dos animais (em especial, nas primeiras 12  
139 horas após o nascimento), falhas na ingestão do colostro e deficiências na antisepsia  
140 do umbigo dos animais recém-nascidos (GOMES, 2021).

141 Estudo com bezerros provenientes de propriedades leiteiras com deficiências na  
142 antisepsia umbilical revelou mortalidade de 18%, enquanto animais criados nas  
143 mesmas condições, submetidos a antisepsia adequada do umbigo, apresentaram 7%  
144 de mortalidade até a desmama. Além de efeito marcante na mortalidade, infecções  
145 umbilicais foram associadas a um menor peso (-2,5 kg) corpóreo aos três meses de  
146 idade (WIELAND et al., 2017).

### 147 **2.2.4 Sinais clínicos**

148 Os principais sinais clínicos observados nas infecções umbilicais são aumento  
149 de volume, dor à palpação e elevação da temperatura local, além de secreção purulenta,  
150 por vezes com odor pútrido (GOMES, 2021). A dilatação ou espessamento do cordão  
151 umbilical comumente é caracterizada como a principal queixa dos criadores (BEAM et  
152 al., 2009). Em certos casos, o umbigo pode estar seco e somente com o diâmetro maior  
153 do que o esperado, embora possa se apresentar infectado (ROBINSON, et al., 2015;  
154 WIELAND et al., 2017).

155 Sinais sistêmicos como febre, apatia, letargia e inapetência sugerem a  
156 disseminação sistêmica de micro-organismos a partir de infecções umbilicais, que  
157 podem evoluir para pneumonia, poliartrite, meningite, abscessos em órgãos e  
158 septicemia (RENGIFO et al., 2006, CONSTABLE et al., 2016).

159 Embora as hérnias umbilicais possam ser causadas por traumatismos ou  
160 malformações, comumente podem estar relacionadas com as infecções umbilicais,  
161 sendo atribuídas a deficiências no processo de antissepsia do umbigo dos bezerros  
162 (ROBINSON, et al., 2015).

### 163 **2.2.5 Diagnóstico**

164 O diagnóstico de rotina das infecções umbilicais em bezerros é baseado na  
165 anamnese, exame físico (incluindo a palpação da região umbilical e abdômen)  
166 (STEINER e LEJEUNE, 2009), bem como o cultivo microbiológico da secreção umbilical  
167 visando a identificação dos agentes e testes de sensibilidade *in vitro* dos isolados aos  
168 antimicrobianos. Ainda, recomenda-se a realização de exames complementares  
169 hematológicos, bioquímicos e por imagem (SHECAIRA et al., 2018; GUERRI et al.;  
170 2020).

171 Exames de imagem (ultrassonografia) e a termometria têm possibilitado avaliar  
172 o comprometimento do umbigo dos bezerros (STEINER e LEJEUNE, 2009, SHECAIRA  
173 et al., 2018; GUERRA et al.; 2020), enquanto exames hematológicos podem indicar  
174 quadro septicêmico do neonato (CONSTABLE et al., 2016). Outros estudos têm  
175 investigado proteínas inflamatórias de fase aguda visando avaliar a gravidade e o  
176 prognóstico das onfalopatias infecciosas em bezerros (RAMOS et al., 2021).

177 Diferentes antimicrobianos têm sido utilizados na monoterapia ou em associação  
178 no tratamento das onfalopatias infecciosas em bezerros (GHARIEB et al., 2019;  
179 GOMES, 2021). Neste contexto, merecem destaque antimicrobianos do grupo dos beta-  
180 lactâmicos e derivados (penicilinas, ceftiofur), aminoglicosídeos (gentamicina,  
181 ampicacina), sulfonamidas, fluoroquinolonas (enrofloxacino), oxitetraciclina e anfenicóis  
182 (florfenicol) (GIGUÈRE et al., 2010, RODRIGUES et al., 2010). No entanto, deve-se  
183 priorizar antimicrobianos de amplo espectro considerando, se possível, a identificação  
184 dos agentes e o perfil de sensibilidade *in vitro* dos isolados aos antimicrobianos  
185 (GHARIEB et al., 2019).

### 186 **2.2.6 Tratamento e prognóstico**

187 O tratamento antimicrobiano parenteral é preconizado para todos os casos de  
188 onfalopatias infecciosas em bezerros. Beta-lactâmicos, aminoglicosídeos,  
189 fluoroquinolonas, e sulfas e trimetoprim são os principais fármacos utilizadas no  
190 tratamento (RODRIGUES et al., 2010; GHARIEB et al., 2019).

191 O cultivo microbiológico, aliado a testes de sensibilidade microbiana *in vitro*,  
192 podem aumentar a eficácia do tratamento das infecções umbilicais em bezerros

193 neonatos. No entanto, por vezes, é necessário o uso de antimicrobianos antes mesmo  
194 de se obter o resultado do cultivo microbiológico e sensibilidade microbiana *in vitro*,  
195 evitando os riscos de desenvolvimento de sepse. Recomenda-se o tratamento  
196 antimicrobiano prolongado das infecções umbilicais em bezerros, por 2 a 4 semanas,  
197 devido ao risco de recidivas observadas em tratamentos com tempo reduzido ou dose  
198 única (WIELAND et al., 2017).

### 199 **2.2.7 Medidas gerais de controle e profilaxia**

200 A adequada antissepsia umbilical após o nascimento dos bezerros é a principal  
201 medida de profilaxia contra as infecções umbilicais. É baseada na limpeza e corte do  
202 cordão umbilical, seguida da imersão do coto umbilical em solução antisséptica, por  
203 vezes cáustica, como soluções de iodo (5-10%) ou clorexidina (2%). Recomenda-se que  
204 esta prática seja repetida por até duas vezes ao dia, até a completa cicatrização, que  
205 ocorre comumente entre 2 e 5 dias após o nascimento (ROBINSON, et al., 2015).

206 Deve-se evitar o reuso da solução antisséptica, posto a redução da eficácia do  
207 produto após o contato com a região umbilical e o acúmulo de sujidades (WIELAND et  
208 al., 2017). Após a antissepsia do umbigo, o bezerro deve ser transferido para ambiente  
209 limpo e seco, destinado exclusivamente aos animais recém-nascidos e jovens (GOMES,  
210 2021).

### 211 **2.3 *E. coli*: propriedades gerais**

212 *E. coli* faz pertence à família Enterobacteriaceae. Apresenta-se sob forma de  
213 bacilos, gram-negativos, anaeróbios facultativos. Esta enterobactéria encontrada na  
214 microbiota intestinal dos animais e humanos (RIBEIRO, LEITE, SIQUEIRA, 2016) e  
215 amplamente nos ambientes de criatórios de animais domésticos. Alguns isolados são  
216 patogênicos devido à presença de múltiplos mecanismos de virulência, que determinam  
217 o estabelecimento de afecções entéricas e extraentéricas (QUINN et al., 2011).

218 Em animais de produção, companhia e selvagens, *E. coli* é associada a elevada  
219 complexidade de quadros clínicos, incluindo diarreia, mastite, endometrite, cistite,  
220 nefrite, artrite, abortamentos, osteomielite, septicemia, endocardite, pneumonia,  
221 conjuntivite e infecções umbilicais, indicando comportamento oportunista do patógeno  
222 (MARWAH et al., 2015; RIBEIRO, LEITE, SIQUEIRA, 2016).

#### 223 **2.3.1 Classificação filogenética**

224 A caracterização da estrutura filogenética de *E. coli* tem sido objeto de vários  
225 estudos - em humanos e animais - por força da evolução dos métodos moleculares,

226 particularmente de sequenciamento do genoma bacteriano. Oito filogrupos (A, B1, B2,  
227 C, D, E, F e clade I) são conhecidos, bem como a presença dos isolados em certas  
228 infecções por *E. coli* pode estar relacionada com a origem filogenética (CLERMONT et  
229 al., 2013).

230 Isolados patogênicos usualmente pertencem aos grupos B2 e D, enquanto  
231 isolados dos grupos A e B1 são comumente comensais na natureza ou encontrados na  
232 microbiota entérica de animais e humanos. A caracterização dos isolados de *E. coli* nos  
233 filogrupos pode ser realizada com base em reação em cadeia pela polimerase (PCR),  
234 que possibilita a identificação de genes específicos (*chuA*, *ijaA*, *arpA* e o fragmento de  
235 DNA TspE4.C2) (CLERMONT et al., 2013).

### 236 **2.3.2 Patotipos DEC**

237 Os patotipos de *E. coli* associados às afecções entéricas (DEC) podem ser  
238 classificados em tipos (classes), norteados pela produção de toxinas, capacidade de  
239 invasão celular e em certas alterações celulares. De modo geral, demonstram  
240 mecanismos de patogênese específicos nas células-alvo, sorotipos diferentes e estão  
241 relacionados com síndromes distintas. Os patotipos diarreio gênicos bem caracterizados  
242 são: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enteroinvasora (EIEC),  
243 produtoras da toxina de Shiga (STEC), enteroagregativa (EAEC) e de aderência difusa  
244 (DAEC) (QUINN et al., 2011; TRABULSI; ALTHERTUM, 2015).

### 245 **2.3.3 ExPEC**

246 Isolados provenientes de infecções extraentéricas (ExPEC) podem,  
247 potencialmente, infectar qualquer órgão ou tecido de origem animal e/ou humana  
248 (TRABULSI; ALTHERTUM, 2015; RIBEIRO, LEITE, SIQUEIRA, 2016). Em humanos,  
249 isolados ExPEC obtidos de meningite neonatal (neonatal meningitis *E. coli* - NMEC) e  
250 afecções uropatogênicas (uropathogenic *E. coli* - UPEC) têm sido objeto de estudos  
251 frequentes (MANGES; JOHNSON, 2015).

252 Em animais, isolados ExPEC têm sido detectados em ampla variedade de  
253 afecções, incluindo distúrbios mamários, pulmonares, geniturinários, dermatológicos e,  
254 ocasionalmente, encefálicos (BÉLANGER et al., 2011; GUERRA et al., 2020).

255 Johnson et al. (2003), nos EUA, sugeriram que isolados de *E. coli* poderiam ser  
256 caracterizados como ExPEC caso possuíssem pelo menos dois dos seguintes genes:  
257 fimbria P (*papC* e/ou *papG*), fimbria S (*sfa/foc*), adesinas da família AFA-DR (*afaC*),  
258 cápsula do grupo capsular II (*kpsMTII*) e o sistema aerobactina de captação de ferro  
259 (*iucD/iutA*). No entanto, tal perfil de *E. coli* ExPEC não foi identificado em estudo no



260 Brasil com isolados obtidos de casos de mastite clínica em vacas (GUERRA et al.,  
261 2019).

#### 262 **2.3.4 Fatores de colonização**

263 A adesão às células do hospedeiro é fator de virulência essencial para a maioria  
264 das bactérias patogênicas. Este mecanismo permite a união da bactéria aos tecidos, e  
265 está relacionado a diferentes tipos de adesinas, que se ligam aos receptores localizados  
266 nas membranas das células-alvo dos hospedeiros (KLEMM; HANCOCK; SCHEMBRI,  
267 2010).

268 As adesinas são formadas por grande variedade de proteínas que se inserem na  
269 membrana bacteriana, cuja função é mediar a ligação (adesão) da bactéria a receptores  
270 de superfícies tanto abióticas (plástico, aço) quanto bióticas (células-alvo),  
271 possibilitando a colonização bacteriana. O mecanismo de adesão às células propicia ao  
272 micro-organismo resistir aos mecanismos naturais de defesa, intrínsecos a certos  
273 sistemas orgânicos, como fluxo da urina, peristaltismo ou ejeção do leite. Outra função  
274 relevante das adesinas é promover a interação entre as bactérias para formação de  
275 microcolônias que, posteriormente, podem evoluir para a formação dos biofilmes  
276 bacterianos (KLEMM; HANCOCK; SCHEMBRI, 2010). As adesinas formam estruturas  
277 proteicas (fímbrias ou pili), que se projetam da superfície para o exterior da bactéria e  
278 encontram receptores nas células-alvo (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). São  
279 conhecidas também adesinas afimbriais (*afa*), que não possuem projeções na superfície  
280 bacteriana, mas possibilitam a adesão por contato direto da bactéria a superfície das  
281 células-alvo (LE BOUGUÉNEC, 2005).

##### 282 **2.3.4.1 Fímbrias**

283 As fímbrias são estruturas proteicas externas com função de adesão. Quando  
284 comparadas com os flagelos estão em maior número, possuem tamanho menor e  
285 espessura mais fina. Estas estruturas são encontradas na maioria dos isolados  
286 comensais e patogênicos de *E. coli*, e promovem a interação do micro-organismo com  
287 os receptores celulares dos hospedeiros (KLINE et al., 2009). As fímbrias são FV  
288 essenciais para muitos isolados patogênicos, incluindo ExPEC. Além de adesão às  
289 células, as fímbrias podem exercer funções adicionais como interação com superfícies  
290 abióticas, agregação celular e produção de biofilmes (TRABULSI; ALTHERTUM, 2015).

#### 291 **2.3.4.2 Fimbrias tipo 1**

292 É a adesina mais frequente da família Enterobacteriaceae, encontrada em mais  
293 de 80% dos isolados de *E. coli*. Apresenta estrutura tubular e helicoidal. É composta  
294 pela haste, formada pela repetição de várias subunidades da proteína majoritária FimA,  
295 e componentes fimbriais minoritários denominados FimF, FimG e FimH (HAHN et al.,  
296 2002; KLEMM; SCHEMBRI, 2004; LE BOUGUÉNEC, 2005).

297 A fímbria tipo 1 pode se ligar a uma ampla variedade de células eucarióticas  
298 (MARTINEZ et al., 2000; ZHOU et al., 2001). Além disso, FimH é capaz de promover  
299 adesão em ambientes com forças de fluxo hemodinâmicas, como o fluxo urinário. Após  
300 a adesão e internalização, as bactérias formam agregados bacterianos intracelulares  
301 (ANDERSON et al., 2003). Este mecanismo de virulência poderia justificar os casos  
302 recorrentes de infecções no trato urinário em animais e humanos por *E. coli* (MARTINEZ  
303 et al., 2000; LE BOUGUÉNEC, 2005). Estudo no Brasil com 114 isolados de *E. coli*  
304 obtidos de vacas com mastite clínica, os genes *fimH* (100%) e *fimA* foram encontrados  
305 com maior frequência (GUERRA et al., 2020).

306 Outro aspecto relativo à fímbria tipo 1 é a participação na adesão inicial às  
307 superfícies para formação de biofilmes, que podem proporcionar vantagem seletiva *in*  
308 *vivo* sob condições líquidas estáticas, como lagoas e piscinas. Considerando ambientes  
309 de criação de animais, este fato é relevante, uma vez que bactérias eliminadas nas fezes  
310 podem formar uma película na superfície da água, que pode ser ingerida por hospedeiro  
311 susceptível (KLEMM; SCHEMBRI, 2004).

#### 312 **2.3.4.3 Fimbrias P**

313 São estruturas com função adesiva codificadas por genes *pap* (pyelonephritis  
314 associated to pili), frequentemente associadas a isolados uropatogênicos (UPEC) em  
315 infecções do trato urinário superior em humanos e animais. A fímbria P reconhece  
316 receptores glicolipídicos nos rins, contribuindo para a colonização nas células  
317 uroepiteliais. Estruturalmente é composta pela proteína majoritária *PapA*, e outras  
318 subunidades proteicas (*PapE*, *PapF*, *PapK* e *PapG*) (PROFT; BAKER, 2009; KLEMM;  
319 HANCOCK; SCHEMBRI, 2010).

#### 320 **2.3.4.4 Fimbrias S (pili S)**

321 A fímbria S é composta principalmente pela proteína adesiva *SfaA* e outras três  
322 proteínas denominadas *SfaG*, *SfaH* e *SfaS* das quais, a última, possibilita a interação  
323 íntima da bactéria com as células do hospedeiro (PRASADARAO et al., 1993). Em  
324 humanos, está relacionada com a habilidade de isolados ExPEC em causar meningite

325 neonatal. Nos isolados ExPEC obtidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), a  
326 fímbria S é a mais comumente identificada nos casos de cistite (KLEMM; HANCOCK;  
327 SCHEMBRI, 2010). Em animais, tem sido identificada em cães com piometra e  
328 infecções do trato urinário (SIQUEIRA et al., 2009).

#### 329 **2.3.4.5 Fimbrias Curli**

330 São estruturas constituídas por finas fibras de tamanhos variados, projetadas da  
331 superfície celular, identificadas tanto em *E. coli* como em outras enterobactérias dos  
332 gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter* e *Enterobacter* (ZOGAJ et al., 2003). São  
333 fimbrias constituídas basicamente por duas proteínas principais: CsgA (majoritária) e  
334 CsgB (BIAN, BRAUNER, NORMARK, 2000). A expressão das fibras Curli foi descrita  
335 em EHEC, ETEC, isolados de sepse, no trato urinário de humanos e infecções em aves  
336 (KAI-LARSEN et al., 2010). Estas fimbrias possuem habilidade em se ligar a proteínas  
337 do soro e tecidos humanos (KLEMM; HANCOCK; SCHEMBRI, 2010).

338 Fimbrias Curli têm sido associadas a invasão, adesão, agregação celular,  
339 formação de biofilmes e como potentes indutores da resposta inflamatória do hospedeiro  
340 (KLEMM; SCHEMBRI, 2004; DYER et al., 2007; PROFT; BAKER, 2009).

#### 341 **2.3.4.6 Fimbrias Antígeno 43**

342 O antígeno 43 (Ag 43) é expresso por várias bactérias gram-negativas. É  
343 encontrado na maioria dos isolados de *E. coli*, principalmente EPEC e UPEC  
344 (KJÆRGAARD et al., 2002). É uma proteína autotransportadora, formada por duas  
345 subunidades:  $\alpha$  e  $\beta$ . A subunidade  $\beta$  é um componente de membrana externa, que forma  
346 poros pelos quais a subunidade  $\alpha$  ganha acesso à superfície bacteriana (HENDERSON;  
347 OWEN, 1999; HENDERSON; NATARO, 2001). Similar a outras adesinas, Ag43 também  
348 confere propriedades de agregação bacteriana e formação de microcolônias,  
349 reconhecidas como precursores de biofilmes (KJÆRGAARD et al., 2002, OLIVO et al.,  
350 2016).

#### 351 **2.3.4.7 Fimbrias Antígeno tipo IV**

352 As fimbrias do tipo IV são estruturas finas (6-8 nm de largura) e flexíveis  
353 relacionadas com a adesão as células hospedeiras e formação de biofilmes. Possuem  
354 movimentos independentes conhecidos como motilidade twitching (PROFT; BAKER,  
355 2009).

### 356 **2.3.5 Mecanismo de captação de ferro (sideróforos)**

357 O ferro é elemento essencial para o metabolismo e multiplicação da maioria das  
358 bactérias. No entanto, a concentração reduzida deste íon em certos tecidos requer que  
359 os patógenos desenvolvam mecanismos de captação exógena ou adaptações para  
360 sobrevivência bacteriana em baixas concentrações deste íon (RUSSO; CARLINO;  
361 JOHNSON, 2001). Para captação exógena do ferro, certas bactérias como *E. coli*  
362 possuem estruturas proteicas denominadas sideróforos, que apresentam alta  
363 quimiotaxia por este íon, requerido particularmente nas infecções extraintestinais  
364 (HANTKE et al., 2003).

365 Outras estratégias bacterianas para obtenção de ferro são a captação a partir de  
366 compostos como heme, transferrina e lactoferrina - sem o uso de sideróforos - e redução  
367 de Fe III a Fe II, com subsequente transporte de Fe II (KÖSTER, 2001). Como exemplos  
368 de sideróforos detectados por métodos moleculares em humanos merecem destaque  
369 os genes *iucD* (HERRERO; LORENZO; NEILANDS, 1988), *irp2* (CZECZULIN et al.,  
370 1999), *iroN* (JOHNSON et al., 2000), *sitA* (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005) e *ireA*  
371 (EWERS et al., 2007). Em animais domésticos, a presença de FV para captação de ferro  
372 exógeno tem sido descrita em infecções do trato geniturinário de cães e na mastite  
373 bovina (SIQUEIRA et al., 2009; GUERRA et al., 2020).

### 374 **2.3.6 Endotoxinas**

375 Endotoxinas são constituintes da membrana das bactérias gram-negativas e,  
376 quando liberadas, possuem potente efeito indutor de processo inflamatório nos  
377 hospedeiros. A endotoxina mais estudada é o lipopolissacarídeo (LPS), presente na  
378 membrana externa de *E. coli* e de outras bactérias gram-negativas. O LPS é composto  
379 pelo lipídeo A e o antígeno O (oligossacarídeos), também chamado de antígeno  
380 somático, utilizado na determinação de sorogrupos de *E. coli*. Na multiplicação ou lise  
381 bacteriana ocorre a liberação do LPS. A fração lipídica induz diferentes níveis de  
382 resposta inflamatória no hospedeiro (PIAZZA; ROCHA; HORTON, 2015). O lipídeo A é  
383 o componente biologicamente ativo, determinante da atividade endotóxica, além de  
384 apresentar propriedades imunogênicas quando exposto na superfície bacteriana  
385 (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

### 386 **2.3.7 Exotoxinas**

387 As exotoxinas de *E. coli* são citotoxinas eliminadas no ambiente entérico e  
388 extraentérico. As hemolisinas, fator citotóxico necrosante (CNF), as toxinas termolábeis

389 (LT) e termoestáveis (ST) de ETEC e as toxina Shiga são as exotoxinas mais estudadas  
390 (MAINIL, 2013).

#### 391 **2.3.7.1 Hemolisinas**

392 As hemolisinas (gene *hly*) são exotoxinas formadas por cadeias simples de  
393 polipeptídeos e recebem este nome devido à ação direta sobre as hemácias. Formam  
394 poros na membrana das células-alvo, provocando a lise celular, facilitando a liberação  
395 do íon ferro utilizado no metabolismo bacteriano (TRABULSI; ALTHERTUM, 2015).  
396 Isolados de *E. coli* que carregam o gene *hly* têm sido identificados em vacas com mastite  
397 clínica (GUERRA et al., 2020).

#### 398 **2.3.7.2 Fator necrosante citotóxico**

399 O fator necrosante citotóxico, codificado pelo gene *cnf*, é uma proteína que se  
400 liga ao receptor celular, provocando intensa reorganização do citoesqueleto de actina  
401 da célula, induzindo a processo de necrose nos tecidos do hospedeiro. São conhecidos  
402 CNF 1, 2 e 3 (VAN BOST; MAINIL, 2003). Este fator de necrose tem sido identificado  
403 em infecções entéricas e, principalmente, extraentéricas, particularmente do trato  
404 geniturinário de humanos (TÓTH et al., 2003). Em bovinos, já foi descrito em animais  
405 com e sem sinais de enterite e em casos de mastite bovina, piometra e infecções do  
406 trato urinário em cães (SIQUEIRA et al., 2009; RIBEIRO, LEITE, SIQUEIRA, 2016;  
407 GUERRA et al., 2020).

#### 408 **2.3.7.3 Resistência ao soro**

409 A capacidade bacteriana de sobreviver a ação dos mecanismos de defesa do  
410 hospedeiro pode ser atribuída a componentes bacterianos como polissacarídeos  
411 capsulares, presença de plasmídeos, proteínas de superfície e às cadeias laterais do  
412 antígeno O, que proporcionam proteção contra a lise do sistema complemento do  
413 hospedeiro (MIAJLOVIC, SMITH, 2014).

414 Os genes que codificam a resistência à atividade bactericida sérica (*iss*, *traT*)  
415 (JOHNSON; STELL, 2000) são FV comuns de enterobactérias como *E. coli*, apesar de  
416 não serem essenciais na patogenicidade (NEMETH, MUCKLE; GYLES, 1994).

417 Os genes *traT* e *ompT* foram identificados em alta frequência em *E. coli* de vacas  
418 com mastite clínica, nas quais o escores de gravidade foram avaliados, sugerindo o uso  
419 destes genes como biomarcadores de casos graves de mastite bovina (GUERRA et al.,  
420 2020).

#### 421 **2.3.7.4 Invasinas**

422 As invasinas são FV envolvidos em infecções por *E. coli* em animais domésticos,  
423 apesar de seus mecanismos de ação não serem totalmente compreendidos.  
424 Constituem-se de filamentos proteicos que se projetam da superfície bacteriana e  
425 favorecem a entrada da bactéria na célula-alvo (MCCULLOCH; MAMIZUCA, 2015). Os  
426 genes das invasinas *ibe* (HUANG et al., 1995) e *ompA* (EWERS et al., 2007) foram  
427 relacionados, respectivamente, a patogenicidade de *E. coli* em células epiteliais  
428 vasculares de humanos e na meningite e infecção urinária de aves, enquanto o gene  
429 *ibe* identificado em vacas com mastite clínica (GUERRA et al., 2020).

#### 430 **2.4 Resistência de *E. coli* aos antimicrobianos**

431 A ocorrência de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos isoladas de  
432 diferentes afecções em humanos e animais é reconhecida como problema emergente,  
433 de ordem mundial (TAVARES, 2007; TRABULSI e ALTHERTUM, 2015). Porém, o  
434 impacto da multirresistência bacteriana em casos de infecções umbilicais em bezerros  
435 não tem sido totalmente esclarecido, estando praticamente restrito a estudos com  
436 onfalopatias em crianças (MARWAH et al., 2015).

437 A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético. O desenvolvimento  
438 de resistência pelos micro-organismos ocorre por via cromossomal (como resultado de  
439 mutações espontâneas) ou pela transferência de material genético entre bactérias.  
440 Entre os mecanismos de transferência, os mais conhecidos são a transdução  
441 (transferência de genes por bacteriófagos), transformação (incorporação de DNA  
442 liberado por outra bactéria), conjugação (transferência de elementos genéticos por  
443 ponte citoplasmática entre bactérias) e/ou transposons (material genético móvel)  
444 (GIGUÈRE et al., 2010).

445 O aumento da ocorrência de bactérias multidrogas resistentes coincidiu com a  
446 utilização em escala de diferentes grupos de antimicrobianos, notadamente a partir da  
447 década de 1960, no tratamento de diferentes manifestações clínicas em humanos e em  
448 animais, e com o uso industrial na conservação de alimentos (TAVARES, 2007).

449 Em humanos, a ocorrência de bactérias multirresistentes é notória em ambientes  
450 hospitalares (WHO, 2014). Em animais de produção, o uso por décadas de  
451 antimicrobianos como “promotores do crescimento” de aves e suínos (ANDRADE e  
452 GIUFFRIDA, 2008), na profilaxia não seletiva da vaca seca, ou mesmo estimulado pelo  
453 apelo comercial de certos fármacos, intensificaram o uso não racional de  
454 antimicrobianos em animais domésticos favorecendo, em tese, o aumento da pressão  
455 seletiva para linhagens multidroga-resistentes (RIBEIRO et al., 2016). No entanto, não

456 foram encontrados estudos relacionados a multirresistência aos antimicrobianos em  
457 bactérias isoladas de casos de infecções umbilicais em bezerros.

458           Considerando a mortalidade de bezerros e os prejuízos aos produtores, aliada a  
459 complexidade etiológica das infecções umbilicais, bem como a escassez de estudos  
460 envolvendo a multirresistência dos isolados aos antimicrobianos, a presença de genes  
461 de *E. coli* ExPEC e a classificação da gravidade dos casos de onfalopatias; o presente  
462 estudo investigou a caracterização de espécies de micro-organismos por espectrometria  
463 de massas (MALDI-TOF/MS) envolvidos em infecções umbilicais em 150 bezerros, os  
464 escores de gravidade clínica das onfalopatias, a resistência múltipla dos isolados aos  
465 antimicrobianos, bem com a presença de 16 genes relacionados a infecções  
466 extraentéricas em isolados de *E. coli* obtidos de onfalopatias de origem infecciosa.  
467

468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503

**CAPÍTULO 2**  
**ARTIGOS CIENTÍFICOS**



## 1774 CONCLUSÃO GERAL

1775 ✓ Grande variedade de espécies de bactérias, fungos e leveduras foram  
1776 identificadas, em cultura pura e/ou em associação, nos animais amostrados,  
1777 ressaltando a complexidade etiológica das infecções umbilicais em bezerros neonatos  
1778 com até 30 dias de idade;

1779 ✓ Enterobactérias - em especial *E. coli* - foram o principal grupo de micro-  
1780 organismos detectados por espectrometria de massas nos animais amostrados,  
1781 reforçando a presença desses agentes de origem ambiental na gênese das infecções  
1782 umbilicais de bezerros neonatos;

1783 ✓ Foi observada a associação significativa entre os genes *ompT* e *traT* nos  
1784 bezerros com escores de gravidade 1 e 2 das onfalopatias, sugerindo que estes genes  
1785 relacionados a resistência ao soro possam ser utilizados como biomarcadores em  
1786 estudos de gravidade clínica das infecções umbilicais em bezerros por *E. coli*;

1787 ✓ A detecção de genes relacionados a resistência ao soro (*traT*, *ompT*, *kpsMTII*),  
1788 adesinas (*papA*, *papC*), invasinas (*ibe10*), produção de sideróforos (*iroN*, *iucD*) e toxinas  
1789 (*hlyA*, *cnf*, *cdt*) nos isolados reforça a complexidade de fatores de virulência que  
1790 caracterizam as infecções por *E. coli* em animais domésticos;

1791 ✓ *Raoutella ornithinolytica*, *Siccibacter turicensis*, *Bacillus licheniformes*,  
1792 *Carnobacterium divergens*, *Comamonas jangadnsis*, *Desemzia incerta*, *Helcococcus*  
1793 *ovis*, *Kocuria marina*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus garveae*, *Leuconostoc lactis*,  
1794 *Vagococcus fluvialis*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Fusarium* spp., *Candida catenulata*, e  
1795 *Candida parapsilosis* foram identificados pela primeira vez como agentes primários de  
1796 infecções umbilicais em bezerros neonatos - utilizando a espectrometria de massas -,  
1797 ressaltando a importância do uso de métodos moleculares no diagnóstico etiológico de  
1798 afecções em medicina veterinária;

1799 ✓ Elevada resistência múltipla (>90%) dos isolados aos antimicrobianos foi  
1800 observada nos bezerros, particularmente com fármacos utilizados há várias décadas em  
1801 medicina veterinária (sulfonamidas, ampicilina e tetraciclina), reforçando a necessidade  
1802 do uso racional de antimicrobianos nos tratamentos de infecções em animais  
1803 domésticos, evitando a pressão seletiva para isolados multirresistentes;

1804 ✓ A complexidade etiológica e os prejuízos relacionados com a infecção  
1805 umbilical em bezerros reforçam a necessidade de ações rigorosas de profilaxia para  
1806 infecções umbilicais em animais neonatos (e.g., antissepsia umbilical e ingestão de  
1807 colostro), bem como medidas específicas voltadas ao ambiente dos animais (e.g.,  
1808 retirada sistemática de fezes e matéria orgânica), em virtude do predomínio de  
1809 enterobactérias, outras bactérias gram-negativas, fungos e leveduras identificadas nos  
1810 animais amostrados.

## 1811 REFERÊNCIA GERAL

- 1812 ANDERSON, G.; PALERMO, J.J.; SCHILLING, J.D.; ROTH, R.; HEUSER, J.;  
1813 HULTGREN, S.J. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections.  
1814 **Science**, v. 301, p. 105-107, 2003.
- 1815 ANDRADE, S.F., GIUFFRIDA, R. 2008. Quimioterápicos antimicrobianos e  
1816 antibióticos, p. 25-72. In: ANDRADE, S.F, **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3.ed.  
1817 São Paulo, Roca.
- 1818 BEAM, A. L.; LOMBARD, J. E.; KOPRAL, C. A.; GARBER, L. P.; WINTER, A. L.;  
1819 HICKS, J. A.; SCHLATER, J. L. Prevalence of failure of passive transfer of immunity in  
1820 newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations,  
1821 **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 8, p. 3973-3980, 2009.
- 1822 BÉLANGER, L.; GARENAUX, A.; HAREL, J.; BOULIANNE, M.; NADEAU, E.; DOZOIS,  
1823 C. M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human  
1824 extraintestinal pathogenic *E. coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.  
1825 62, n. 1, p. 1–10, 2011.
- 1826 BENESI, F. J.; TEIXEIRA, C. M. C.; LEAL, M. L. R.; LISBOA, J. A. N.; MIRANDOLA,  
1827 R.M.S.; SHECAIRA, C. L.; GOMES, V. Leukogram of healthy Holstein calves within the  
1828 first month of life. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 352-356, 2012.
- 1829 BIAN, Z.; BRAUNER, A.; LI, Y.; NORMARK, S. Expression of and cytokine activation  
1830 by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**,  
1831 v. 181, p. 602–612, 2000.
- 1832 CARDONA Á. J., ÁLVAREZ P. J., & ARRIETA B. G. Aislamiento e identificación de  
1833 agentes bacterianos productores de onfalitis en terneros del departamento de córdoba.  
1834 **Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica**. v.14, n. 2, p. 95 – 99, 2011.
- 1835 CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J.K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The  
1836 Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and  
1837 detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, p. 58–65,  
1838 2013.
- 1839 CONSTABLE PD, HINCHLIFF KW, DONE S, GRUENBERG W. **Veterinary medicine:  
1840 a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 11th ed.  
1841 Philadelphia: Saunders Ltd; 2016.
- 1842 CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli*  
1843 pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26–38, 2010.
- 1844 CZECZULIN, J.R.; WHITTAM, T.S.; HENDERSON, I.R.; NAVARRO-GARCIA, F.;  
1845 NARATO, J.P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent  
1846 *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.67, p. 2692-2699, 1999.
- 1847 DYER, J. G.; SRIRANGANATHAN, N.; NICKERSON, S. C.; ELVINGER, F. Curli  
1848 production and genetic relationships among *Escherichia coli* from cases of bovine  
1849 mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 193-201, Jan 2007.
- 1850 EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIEBLING, S.; ALT, K.; ANTÃO, E.M.; LATURNUS,  
1851 C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BÖHNKE, U.; STEINRÜCK, H.; PHILIPP,

- 1852 H.C.; WIELER, L.H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing  
1853 *Escherichia coli*: How closely related are they? **International Journal of Medical**  
1854 **Microbiology**, v. 297, p. 163–176, 2007.
- 1855 FARADONBEH, Y. K. & FARADONBEH, M. K. Evaluate the risk factors umbilical cord  
1856 bacterial infection in calves in Shahrekord city. **Journal of Entomology and Zoology**  
1857 **Studies**, v. 4, n. 2, p. 162-166, 2016.
- 1858 GHARIEB, R. et al. Antibiogram, virulotyping and genetic diversity of *Escherichia coli*  
1859 and *Salmonella* serovars isolated from diarrheic calves and calf handlers.  
1860 **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.67, p.101367,  
1861 2019.
- 1862 GIGUÈRE, S., PRESCOTT, JF., BAGGOT, JD., WALKER, RD., DOWLING PM.  
1863 **Terapia antimicrobiana em medicina veterinária**. 4.ed. Roca, São Paulo. 2010,  
1864 683p.
- 1865 GOMES, V. Doenças na fase de aleitamento e práticas de manejo sanitário na criação  
1866 de bezerras. **Revista Brasileira de Buiatria**. v.1. n.2, 2021.
- 1867 GUERRA, S. T., ORSI, H., JOAQUIM, S. F., GUIMARAES, F. F., LOPES, B. C.,  
1868 DALANEZI, F. M., et al. Short Communication: Investigation of Extra-Intestinal  
1869 Pathogenic *Escherichia Coli* Virulence Genes, Bacterial Motility, and Multidrug  
1870 Resistance Pattern of Strains Isolated From Dairy Cows With Different Severity Scores  
1871 of Clinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 3606–3614, 2020.
- 1872 GUERRA, ST , DALANEZI, FM , DE PAULA, CL.; HERNANDES, RT.; PANTOJA,  
1873 JCF.; LISTONI, FJP.; LANGONI, H.; RIBEIRO, MG. Fatores de virulência putativos de  
1874 *Escherichia coli* extra-intestinal isolada de mastite bovina com diferentes escores  
1875 clínicos. **Letters in Applied Microbiology**, v. 68, p. 403-8, 2019.
- 1876 HAHN, E.; WILD, P.; HERMANN, U.; SEBBEL, P.; GLOCKSHUBER, R.; HÄNER, M.;  
1877 TASCHNER, N.; BURKHARD, P.; AEBI, U.; MÜLLER, A. Exploring the 3D Molecular  
1878 Architecture of *Escherichia coli* Type 1 Pili. **Journal of Molecular Biology**, v. 323, n.  
1879 02, p. 845–857, 2002.
- 1880 HANTKE, K.; NICHOLSON, G.; RABSCH, W.; WINKELMANN, G. Salmochelins,  
1881 siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are  
1882 recognized by the outer membrane receptor IroN. **Proceedings of the National**  
1883 **Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, p. 3677–3682, 2003.
- 1884 HENDERSON, I.R.; NATARO, J.P. Virulence Functions of Autotransporter Proteins.  
1885 **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1231–1243, 2001.
- 1886 HENDERSON, I.R.; OWEN, P. The major phase-variable outer membrane protein of  
1887 *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of  
1888 exported protein and is regulated by a novel mechanism involving *dam* and *OxyR*.  
1889 **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 7, p. 2132–2141, 1999.
- 1890 HERRERO, M.; LORENZO, V.D.E.; NEILANDS, J.B. Nucleotide sequence of the *iucD*  
1891 gene of the pColV-K30 aerobactin operon and topology of its product studied with *phoA*  
1892 and *lacZ* gene fusions. **Journal Bacteriology**, v. 170, n. 1, p. 56–64, 1988.
- 1893 HUANG, S.H.; WASS, C.; FU, Q.; PRASADARAO, N. V; STINS, M.; KIM, K.S.  
1894 *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo:

- 1895 molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. **Infection Immunity**, v.  
1896 63, n. 11, p. 4470–4475, 1995.
- 1897 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária**  
1898 **Municipal**. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. v. 48, Rio de Janeiro,  
1899 Brazil, 2020.
- 1900 JOHNSON, J.; STELL, A. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains  
1901 from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **Journal of**  
1902 **Infectious diseases**, v.181, n.1, p. 261-272, 2000.
- 1903 JOHNSON, J.R.; MURRAY, A.C.; GAJEWSKI, A.; SULLIVAN, M.; SNIPPES, P.;  
1904 KUSKOWSKI, M.A.; SMITH, K.E. Isolation and molecular characterization of nalidixic  
1905 acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products.  
1906 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 7, p. 2161–2168, 2003.
- 1907 JOHNSON, J.R.; RUSSO, T.A.; TARR, P.I.; CARLINO, U.; BILGE, S.S.; VARY, J.C.;  
1908 STELL, A.L. Molecular epidemiological and pylogenetic associations of two novel  
1909 putative virulence genes, *iha* and *iroN* *E. coli*, among *Escherichia coli* isolates from  
1910 patients with urosepsis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 3040–3047, 2000.
- 1911 KAI-LARSEN, Y.; LÜTHJE, P.; CHROMEK, M.; PETERS, V.; WANG, X.; HOLM, Å.;  
1912 KÁDAS, L.; HEDLUND, K.O.; JOHANSSON, J.; CHAPMAN, M.R., JACOBSON, S.H.;  
1913 RÖMLING, U., AGERBERTH, B., BRAUNER, A. Uropathogenic *Escherichia coli*  
1914 modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial  
1915 peptide LL-37. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 7, p.1-16, 2010.
- 1916 KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature**  
1917 **Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.
- 1918 KJÆRGAARD, K.; HASMAN, H.; SCHEMBRI, M.A.; KLEMM, P. Antigen 43-Mediated  
1919 autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system. **Journal**  
1920 **of Bacteriology**, v. 184, n. 15, p. 4197–4204, 2002.
- 1921 KLEMM, P.; HANCOCK, V.; SCHEMBRI, M. A. Fimbrial adhesins from extraintestinal  
1922 *Escherichia coli*. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 5, p. 628–640, 2010.
- 1923 KLEMM, P.E.R.; SCHEMBRI, M. Type 1 fimbriae, curli, and antigen 43: adhesion,  
1924 colonization, and biofilm formation. **EcoSal Plus**, p. 1–18, 2004.
- 1925 KLINE, K.A.; FÄLKER, S.; DAHLBERG, S.; NORMARK, S.; HENRIQUES-NORMARK,  
1926 B. Review bacterial adhesins in host-microbe interactions. **Cell Host & Microbe**, v. 5,  
1927 p. 580–592, 2009.
- 1928 KÖSTER, W. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and  
1929 vitamin B 12. **Research in Microbiology**, v. 152, p. 291–301, 2001.
- 1930 LE BOUGUÉNEC, C. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*.  
1931 **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 471–478, 2005.
- 1932 MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and**  
1933 **Immunopathology**, v. 152, n. 1–2, p. 2–12, 2013.
- 1934 MANGES, A.R.; JOHNSON, J.R. Reservoirs of extraintestinal pathogenic *Escherichia*  
1935 *coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 5, p. 1–12, 2015.

- 1936 MARTINEZ, J.J.; MULVEY, M.A.; SCHILLING, J.D.; PINKNER, J.S.; HULTGREN, S.J.  
1937 Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **The EMBO**  
1938 **Journal**, v. 19, n. 12, p. 2803–2812, 2000.
- 1939 MARWAH, P.; CHAWLA, D.; CHANDER, J.; GUGLANI, V.; MARWAH, A.  
1940 Bacteriological profile [13] of neonatal sepsis in a tertiary-care hospital of Northern  
1941 India. **Indian Pediatric**. v. 52, n.2, p.158–59, 2015.
- 1942 MCCULLOCH, J.A.; MAMIZUCA, E.M. *Staphylococcus aureus*. In: Trabulsi, L. R.;  
1943 Alterthum, F. **Microbiologia**: São Paulo: Atheneu, 6.ed., 2015, p.179-188.
- 1944 MIAJLOVIC, H.; SMITH, S. Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum  
1945 killing. **FEMS microbiology letters**, v. 354, n. 1, p. 1-9, 2014.
- 1946 NEMETH, J.; MUCKLE, C.A.; GYLES, C. L. In vitro comparison of bovine mastitis and  
1947 fecal *Escherichia coli* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 231–238, 1994.
- 1948 OLIVO, G., LUCAS, T.M., BORGES, A.S., SILVA, R.O.S.; LOBATO, F.C.F.;  
1949 SIQUEIRA, A.K.; SILVA LEITE, D.; BRANDÃO, P.E.; GREGORI, F.; OLIVEIRA-FILHO,  
1950 J.P.; TAKAI, S.; RIBEIRO, M.G. Enteric pathogens and coinfections in foals with and  
1951 without diarrhea. **BioMed Research Internacional**. 1512690, 2016.
- 1952 PIAZZA, R.M.F.; ROCHA.; HORTON. Fatores de virulência II: Toxinas. *In: Trabulsi-*  
1953 **Alterthum Microbiologia**. Alterthum, F. São Paulo: Atheneu. 6.ed. 2015. p.147 – 154.
- 1954 PRASADARAO, N.V; WAS, C.A.; HACKERG, J.; JANNLL, K.; KIM, K.S. Adhesion of  
1955 S-fimbriated *Escherichia coli* to brain glycolipids mediated by *sfaA* gene-encoded  
1956 protein of S-Fimbriae. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 14, p. 10356–  
1957 10363, 1993.
- 1958 PROFT, T.; BAKER, E.N. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure,  
1959 assembly and their role in disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p.  
1960 613–635, 2009.
- 1961 QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.;  
1962 HARTIGAN, P. J. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**, 2nd edn. Wiley-  
1963 Blackwell, UK. pp. 334–341, 2011.
- 1964 RAETZ, C.R.H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of**  
1965 **Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 635–700, 2002.
- 1966 RAMOS, JS.; MADUREIRA, KM.; SILVA, KN.; BOSCOL, KA.; MORITA, M.;  
1967 GUIMARÃES, JE.; GOMES, V. Haptoglobin and its association with naturally occurring  
1968 diseases in Holstein heifer calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**  
1969 **Zootecnia**. v. 73, n. 3, 2021.
- 1970 REIS, A. S. B.; PINHEIRO, C. P.; LOPES, C. T. A.; CERQUEIRA, V. D.; OLIVEIRA, C.  
1971 M. C.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D. Onfalopatias em bezerros de rebanhos  
1972 leiteiros no nordeste do estado do Pará. *Ciência Animal Brasileira*, **In: VIII Congresso**  
1973 **Brasileiro de Buiatria**, 1, 2009, Belo Horizonte. **Anais do VIII Congresso Brasileiro de**  
1974 **Buiatria**, Belo Horizonte, 2009. p. 29-34.
- 1975 RENGIFO, S. A.; SILVA, R. A.; PEREIRA, I. A.; ZEGARRA, J. Q.; SOUZA, M. M.;  
1976 BOTTEON, R. C. C. M. Isolamento de agentes microbianos a partir de amostras de  
1977 sangue e umbigo de bezerros mestiços neonatos. **Brazilian Journal of Veterinary**  
1978 **Research Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 442-447, 2006.

- 1979 RIBEIRO, M.G.; LEITE, D.S.; SIQUEIRA, A.K. *Enfermidades por Escherichia coli*. in:  
1980 MEGID, K.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças infecciosas em animais de**  
1981 **produção e companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016, p. 243-273.
- 1982 ROBINSON, A. L., L. L. TIMMS, K. J. STALDER, AND H. D. TYLER. 2015. Short  
1983 communication: The effect of 4 antiseptic compounds on umbilical cord healing and  
1984 infection rates in the first 24 hours in dairy calves from a commercial herd. **Journal**  
1985 **Dairy Science**. 2015.
- 1986 RODRIGUES, C. A.; SANTOS, P. S. P.; PERRI, S. H. V.; TEODORO, P. H. M.;  
1987 ANHESINI, C. R.; ARAÚJO, M. A.; VIANA FILHO, M. N. Correlação entre os métodos  
1988 de concepção, ocorrência e formas de tratamento das onfalopatias em bovinos: estudo  
1989 retrospectivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 8, p. 618-622, 2010.
- 1990 RODRIGUEZ-SIEK, K.E.; GIDDINGS, W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T,J,. NOLAN,  
1991 L.K. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, v. 36, p. 241-256,  
1992 2005.
- 1993 RUSSO, T.A.; CARLINO, U.B.; JOHNSON, J.R. Identification of a new iron-regulated  
1994 virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*.  
1995 **Infection and Immunity**, v. 69, n. 10, p. 6209–6216, 2001.
- 1996 SHECAIRA, C.L.; SEINO, C.H.; BOMBARDELLI, J.A.; REIS, G.A.; FUSADA, E.J.;  
1997 AZEDO, M.R.; BENESI, F.J. Using thermography as a diagnostic tool for omphalitis on  
1998 newborn calves, **Journal of Thermal Biology**, Volume 71, p. 209-211, 2018.
- 1999 SIQUEIRA, A.K.; RIBEIRO, M.G.; LEITE, D.S.; TIBA, M.R.; MOURA, C.D.; LOPES,  
2000 M.D.; PRESTES, N.C.; SALERNO, T.; SILVA, A.V. Virulence factors in *Escherichia coli*  
2001 strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of  
2002 healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 2, p. 206-210, 2009.
- 2003 STEINER, A., AND B. LEJEUNE. Ultrasonographic assessment of umbilical disorders.  
2004 **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 25:781–794, 2009.
- 2005 TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. São Paulo: Atheneu,  
2006 2007. 585p.
- 2007 TÓTH, I.; HÉRAULT, F.; BEUTIN, L.; OSWALD, E. Production of cytolethal distending  
2008 toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources:  
2009 Establishment of the existence of a new *cdt* variant (Type IV). **Journal of Clinical**  
2010 **Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4285-4291, 2003.
- 2011 TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6ed. São Paulo: Atheneu, 2015.  
2012 920p.
- 2013 VAN BOST, S.; MAINIL, J. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches  
2014 invasives d' *Escherichia coli*: III) Production de toxines. **Annales Médecine**  
2015 **Vétérinaire**, v. 147, p. 327–342, 2003.
- 2016 WHO - World Health Organization. Critically Important Antimicrobials for Human  
2017 Medicine, 5th Revision. [(accessed on 19 march 2022)]; Available online:  
2018 <https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/>.
- 2019 WIELAND, M; MANN, S.; GUARD, C.L.; NYDAM.D.V. The influence of 3 different  
2020 navel dips on calf health, growth performance, and umbilical infection assessed by

- 2021 clinical and ultrasonographic examination. **Journal Dairy Science**. 100: p.513–524,  
2022 2017.
- 2023 WINDEYER, M. C., K. E. LESLIE, S. M. GODDEN, D. C. HODGINS, K. D.  
2024 LISSEMORE, AND S. J. LEBLANC. Factors associated with morbidity, mortality, and  
2025 growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Preventive Veterinaria Medicine**,  
2026 v. 113, p. 231–240, 2014.
- 2027 ZHOU, G.; MO, W.; SEBBEL, P.; MIN, G.; NEUBERT, T.A.; GLOCKSHUBER, R.  
2028 Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from  
2029 in vitro *fimH* binding. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 22, p. 4095–4103, 2001.
- 2030 ZOGAJ, X.; BOKRANZ, W.; NIMTZ, M.; RÖMLING, U. Production of cellulose and curli  
2031 fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human  
2032 gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4151–4158, 2003.