

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

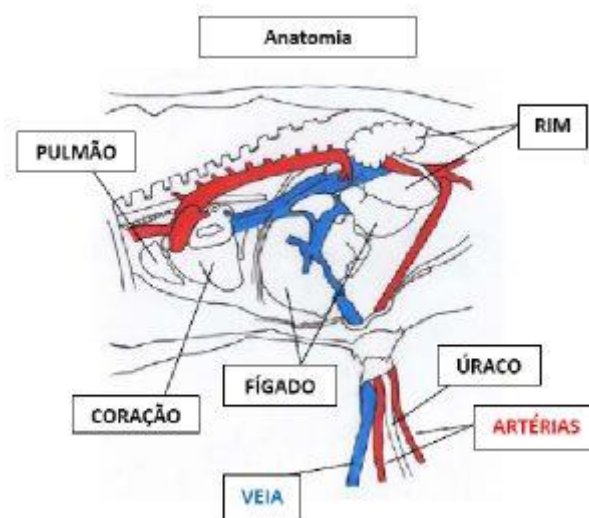
79 As doenças neonatais em bovinos são multifatoriais e estão relacionadas a
80 interação entre patógenos, deficiências higiênico-sanitárias na maternidade, deficiente
81 ingestão de colostro e, especialmente, a ineficácia no procedimento de antissepsia
82 umbilical dos bezerros nos primeiros dias de 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 ampicilina), sulfonamidas, fluoroquinolonas (enrofloxacina), oxitetraciclinas 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 antisepsia 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 antisepsia 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 diarréio-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: α e β . A subunidade β é um componente de membrana externa, que forma
346 poros pelos quais a subunidade α 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

504 ARTIGO 1

505 **Short communication: Virulence genes related to extra-intestinal *E. coli* and**
 506 **multidrug-resistant pattern of strains isolated from neonatal calves with different**
 507 **severity scores of umbilical infections***
 508

509 **Lorrayne de Souza A. Martins,¹ Rodrigo G. Motta,² Antônio C. Martinez,²**
 510 **Henrique Orsi,³ Rodrigo T. Hernandez,³ Vera L.M. Rall³, and Márcio G. Ribeiro^{1*}**

511 ¹Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary
 512 Medicine and Animal Sciences, Sao Paulo State University, Botucatu, SP 18618 681, Brazil

513 ²Department of Veterinary Medicine, State University of Maringá, Umuarama, PR 87507 190,
 514 Brazil.

515 ³Department of Microbiology and Immunology, Sao Paulo State University, Botucatu, SP 18618
 516 689, Brazil

517 **ABSTRACT**

518 Umbilical infections in calves represent one of the main causes of losses to the dairy
 519 industry due to the dissemination of microorganisms from the umbilical region causing
 520 clinical complications such as polyarthritis, pneumonia, visceral abscesses, and sepsis
 521 that may lead to premature disposal, animal replacement, and high neonatal mortality.
 522 *E. coli* is well-known enterobacteria, opportunistic in nature, and widely distributed in the
 523 environment, characterized by a diversity of virulence factors (VF). Nonetheless, the
 524 specific gene profiles that encode VF associated with umbilical infections in calves, in
 525 addition to the influence of these virulence properties on clinical severity scores of
 526 umbilical infections remains unclear. Therefore, a panel of 16 virulence-encoding genes
 527 related to extra-intestinal *E. coli* (ExPEC) infections were investigated, *i.e.*,
 528 fimbriae/adhesins (*sfa/focDEa*, *papA*, *papC*, *afaBC*), toxins (*hlyA*, *sat*, *cnf1*, *cdt*),
 529 siderophores (*iroN*, *irp2*, *iucD*, *ireA*), invasins (*ibe*), and mechanisms of serum resistance
 530 (*ompT*, *traT*, *kpsMT II*) among 150 neonatal calves (≤ 30 days-of-age) with clinical signs
 531 of umbilical infections. The omphalopathies were clinically classified as scores 1 (mild),
 532 2 (moderate), and 3 (severe). *E. coli* strains were identified at the species level based
 533 on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
 534 (MALDI-TOF MS). Of 150 cases, 59 (39.3%) *E. coli* strains were isolated in pure culture
 535 (27/59=45.8%) or coinfections (32/59=54.2%). Clinical severity scores 1, 2, and 3 of
 536 umbilical infections related-*E. coli* were observed in 32.2% (19/59), 23.7% (14/59), and
 537 44.1% (26/59) calves, respectively. The main virulence-associated genes encoded were
 538 serum resistance (*traT*, 42/59=72.2%; *ompT*, 35/59=59.3%, *kpsMTII*, 10/59=17%),
 539 invasins (*ibe*, 11/59=18.6%), siderophores (*iucD*, 9/59=15.3%; *iroN*, 8/59=13.6%), and
 540 adhesins/fimbriae (*papA*, 8/59=13.6%; *papC*, 15/59=9.6%). A variety of associations
 541 among genes studied was seen, and the most common occurred between *ompT* and
 542 *traT* (6/59=10.2%), particularly in calves with severity scores 1 (4/19=23.5%) and 2
 543 (2/14=14.3%) showing a significant difference ($p < 0.0001$), whereas *iroN* and *traT*
 544 (2/26=8%), and *ibeA*, *ompT*, and *traT* co-occurrence (2/26=8%) were the most common
 545 associations in cases score 3. Among all *E. coli* isolates, 89.8% (53/59) revealed in vitro
 546 resistance to sulfamethoxazole/trimethoprim, 59.3% to ampicillin (35/59), and 57.6% to
 547 tetracycline (34/59), while 94.1% (55/59) were considered multidrug-resistant isolates.
 548 Here, the high occurrence of *E. coli* (39.3%) in sampled calves reinforces the role of this
 549 enterobacteria on the etiology of umbilical infections in calves. In addition, a panel of
 550 virulence-associated ExPEC genes was investigated for the first time among calves
 551 where clinical severity scores of umbilical infections were assessed. The high prevalence
 552 of *traT* (72,2%) and *ompT* (59,3%) indicates that these serum resistance-related genes

*Artigo formatado conforme as normas da revista Journal of Dairy Science (Short communication)

553 could be used as biomarkers to further investigations of ExPEC for umbilical infections
554 from neonatal calves. Results of this study contribute to the etiological characterization,
555 clinical severity scores investigation, antimicrobial resistance pattern, and virulence
556 mechanisms of ExPEC variants involved in umbilical infections of neonatal calves.

557

558 **Keywords:** Neonatal calf, infectious omphalopathies, ExPEC genes, MALDI-TOF MS.

559

560

Short communication

561

562 Umbilical infections in neonatal calves represent a major cause of losses to dairy
563 farmers (Bozukluhan et al., 2018) due to the dissemination of micro-organisms from the
564 umbilical region causing complications in other organs, including polyarthritis,
565 pneumonia, organ abscesses, and sepsis, which may result in premature disposal,
566 animal replacement, and high neonatal mortality (Windeyer et al., 2014). The umbilical
567 infections occur secondary to exposure of remnant cord to the farm environment, e.g.,
568 soil, feces, organic matter, farm utensils, and contaminated water (Faradonbeh and
569 Faradonbeh, 2016). The main risk factors for developing umbilical infections in neonatal
570 calves have been intimately related to improper antiseptics of the umbilical region,
571 deficient ingestion of colostrum in the first hours after birth, and excess feces and organic
572 matter in the environment of farms (Salci et al., 2017).

573

574 A complexity of microorganisms has been reported as a primary cause of
575 umbilical infections in neonatal calves, e.g., staphylococci, streptococci, some
576 actinomycetes, and enterobacteria, particularly *Escherichia coli* (Cardona et al., 2011;
577 Faradonbeh and Faradonbeh, 2016).

577

578 *Escherichia coli* is well-known enterobacteria that belong to the normal gut of
579 humans and multihost animals is opportunistic in nature and is widely distributed in the
580 environment (Croxen and Finlay, 2010), including dairy farms (Cardona et al., 2011;
581 Gharieb et al., 2019). A set of virulence factors (VF) have been investigated in *E. coli*-
582 induced infections among humans and animals, represented by endo- and exotoxins,
583 adherence mechanisms of the pathogen to host cells, iron uptake, and ability to invade
584 and resist the serum immune response (Sarowska et al., 2019).

584

585 Based on the presence of different VF, ability to invade and infect different cells,
586 and some clinical manifestations of hosts, *E. coli* has been traditionally classified in
587 intestinal or extra-intestinal (ExPEC) variants, which exhibit a wide variety of clinical
588 signs in humans, livestock, companion animals, and wildlife (Croxen and Finlay, 2010;
589 Manges and Johnson, 2015). Nonetheless, unlike diarrheagenic *E. coli*-induced
590 infections (Croxen et al., 2013), the specific gene profiles that encode VF related to
591 umbilical infections in calves remains unclear. In addition, likewise clinical cases of
592 bovine mastitis-related *E. coli* (Guerra et al., 2020), the influence of genes associated

592 with ExPEC disorders and clinical severity scores of umbilical infections is poorly
593 understood (VAN Bost and Mainil, 2003).

594 An increase in bacterial multidrug resistance has been seen as an emergent
595 global concern (Murray et al., 2022), including variants isolated from neonatal calves that
596 have difficult therapeutic approaches using conventional antimicrobials (Schönecker et
597 al., 2020).

598 In this scenario, considering the economic losses and high prevalence of
599 umbilical infections in neonatal calves commonly caused by *E. coli*, the diversity of VF
600 and multidrug resistance pattern of *E. coli* variants, in addition to the lack of data
601 regarding ExPEC genes that encodes virulence mechanisms and its influences on
602 clinical severity scores of umbilical infections, we investigated the relationship of a panel
603 of 16 virulence-encoding genes related pathogenic ExPEC and multidrug-resistant
604 pattern of 59 *E. coli* isolates obtained from 150 neonatal calves where clinical scores of
605 the severity of umbilical infections were assessed.

606 Farms and herds were eligible for sampling neonatal calves if they met the
607 following criteria: i) presence of calf pen, ii) no use of antimicrobials seven days before
608 sampling of umbilical specimens, iii) <30 days of the age of calves sampled.

609 A sample of 150 calves from Holstein, Jersey, Gir and cross-breed with clinical
610 signs compatible with umbilical infections was used. The calves belonged to 27 farms in
611 Sao Paulo, Minas Gerais, Goias, and Parana states from Brazil, where bovine farming
612 is a common activity. Samples were collected between the 2020 and 2021 periods from
613 all calves that experienced clinical signs of umbilical infections on eligible farms. Calves
614 sampled had an average age of 9.4 days (1 - 30 days of age), of which 42% (63/150)
615 were male and 58% (87/150) female animals. The climate of farms sampled is
616 characterized by tropical temperatures. The calves were from medium-scale farms
617 (defined here as farm holdings between 20-200 hectares), with different average sizes
618 of herds. All the animals were grazed, with similar conditions of nutrition, management
619 facilities, technical degree, and sanitary conditions, including mandatory vaccines. Data
620 from clinical complications secondary umbilical infections of calves and outcomes were
621 obtained six months after birth.

622 The clinical severity scores of umbilical infections were defined according to
623 previously published (Hintz et al., 2019; Steerforth and Winden, 2018; Rodrigues et al.,
624 2010) with some modifications, as follows: score 0 (normal), umbilical cord presenting
625 involution process, without pain, enlargement or other inflammatory signs, and calf
626 healthy; score 1 (mild), pain at local palpation, increase of local temperature, endurance
627 or enlargement of the umbilical cord (>1 cm in diameter); score 2 (mild), presence of
628 purulent secretion in the umbilical region and increase of local temperature at palpation;

629 and score 3 (severe), signs of score 2 cited above, in addition, to increase of rectal
630 temperature at palpation (40°C), systemic signs (fever, loss of appetite, apathy,
631 respiratory distress, tachycardia) or presence of an umbilical hernia.

632 The samples were collected only of calves presenting clinical gravity scores 1, 2,
633 and 3. All the umbilical specimens were collected by the same veterinarian trained to
634 recognize the three levels of clinical severity scores of umbilical infections. Samples were
635 collected using sterile swabs, after rigorous antisepsis (70% alcohol plus iodine 2%) of
636 the external region of the navel, using manual contention of calves. The swabs were fully
637 introduced in the navel and immediately introduced into transport media (Absorve™,
638 Hangzhou, CHN) and kept refrigerated (4-8° C).

639 All umbilical specimens were streaked onto defibrinated blood agar (5%) and
640 MacConkey agar (Oxoid, Basingstoke, UK). The plates were incubated at 37°C under
641 aerobic conditions for 72 hours. Colonies compatible with enterobacteria were subjected
642 to conventional phenotypic tests (Quinn et al., 2011), and *E. coli* isolates were stored in
643 duplicate at -20°C and 25°C in Lignieris media, to further confirmation of *E. coli* species
644 based on mass spectrometry. Umbilical infection was defined as the presence of at least
645 5 CFU of *E. coli*.

646 A panel of 16 virulence genes of ExPEC-related infections that encodes
647 fimbriae/adhesins (*sfa/focDEa*, *papA*, *papC*, *afaBC*), toxins (*hlyA*, *sat*, *cnf1*, *cdt*),
648 siderophores (*iroN*, *irp2*, *iucD*, *ireA*), invasins (*ibeA*), and mechanisms of serum
649 resistance (*ompT*, *traT*, *kpsMT II*) were investigated. Briefly, all *E. coli* colonies were
650 suspended in 200 µL of sterile water, and suspensions were boiled for 10 min, and frozen
651 for 10 min. The suspensions were centrifuged at 10,000 × g for 1 min (Centrifuge 5424
652 R, Eppendorf, Hamburg, Germany), and the supernatants were used for the PCR as the
653 DNA template. PCR was performed using GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison,
654 WI, USA) with 0.34 µM of each of the primers. All primer sequences and PCR assay
655 conditions used for the detection of virulence genes are described in the references cited
656 in Table S1. Then, amplification was performed in a thermocycler (GeneAmp PCR
657 System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA) with cycle conditions as follows:
658 initial heating at 95°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 s,
659 annealing at variable temperatures based on the primer for 30 s, and extension at 72°C
660 for 1 min. PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis, prepared with
661 Tris-borate-EDTA (TBE) buffer, and visualized with SYBR Safe DNA Gel Stain
662 (Invitrogen, CA, USA). The images were recorded by an image capture system
663 (Alphalmager 2200, Alpha Innotech, San Leandro, CA).

664 *E. coli* confirmation at the species level was performed using matrix-assisted
665 laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, Bruker,

666 and DaltonicsTM, Bremen, Germany) with a 337-nm laser. Spectra were analyzed
667 between 2.000-20.000 m/z using FlexControl 3.3 software. Characterization of the *E. coli*
668 at the genus and species level was considered with ≥ 1.7 and ≥ 2.0 , respectively (Barreiro
669 et al., 2010; Gonçalves et al., 2014).

670 Fifty-nine *E. coli* isolates were subjected to in vitro antimicrobial susceptibility
671 testing using the disc diffusion method, according to the Clinical Laboratory Standard
672 Institute-CLSI (CLSI, 2020a,b) guidelines. Seven different antimicrobial groups,
673 represented mainly by drugs used in therapy approaches to umbilical infections of calves
674 were tested: (1) aminoglycosides (10 μg of gentamicin), (2) amphenicols (30 μg of
675 florfenicol), (3) cephalosporins (30 μg of ceftiofur), (4) fluoroquinolones (5 μg of
676 enrofloxacin, 5 μg of marbofloxacin), (5) penicillin and aminopenicillins (10 μg of
677 ampicillin, 30 μg of amoxicillin plus clavulanic acid), (6) sulfonamides (25 μg of
678 trimethoprim/sulfamethoxazole), (7) tetracyclines (30 μg of tetracycline).

679 The sample size was calculated based on a 20% prevalence of umbilical
680 infections in calves, with a prevalence estimated at 10% cases by *E. coli* (CARDONA et
681 al. 2011; FARADONBEH et al., 2016) and an error of $\pm 5\%$, resulting in the estimated
682 sampling of minimum 139 calves, using OPEN EPI program. The virulence factors and
683 the frequencies of genes related to ExPEC were obtained, and comparisons of chi-
684 square (or Fisher) test proportions were applied to evaluate the prevalence, discarding
685 the genes without detection. Severity scores were obtained from profile frequencies of
686 genes and combinations. The most frequent genes were compared again using the chi-
687 square (or Fisher) test for differences in proportions between severity scores. Tests were
688 based on R program version 3.6.1 and SAS for Windows version 9.4, and the level of
689 significance was set at 0.05.

690 *E. coli* was isolated from 39.3% (59/150) of umbilical infections cases, of which
691 45.8% (27/59) in pure culture and 54.2% (32/59) combined infections, associated
692 predominantly with other enterobacteria (Table 1).

693

694 Table 1. Isolation of *E. coli* in pure culture and coinfections in 59 neonatal calves with
 695 umbilical infections identified based on mass spectrometry*. Brazil, 2020-2021.
 696

Micro-organisms	N	%
<i>Escherichia coli</i>	27	45,76
<i>Escherichia coli</i> + <i>Aspergillus fumigatus</i>	2	3,38
<i>Escherichia coli</i> + <i>Aspergillus terreus</i>	2	3,38
<i>Escherichia coli</i> + <i>Proteus vulgaris</i>	2	3,38
<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterobacter cloacae</i>	1	1,70
<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterobacter cancerogenus</i>	1	1,70
<i>Escherichia coli</i> + <i>Escherichia hermannii</i>	1	1,70
<i>Escherichia coli</i> + <i>Morganella morganii</i>	1	1,70
<i>Escherichia coli</i> + <i>Proteus hauseri</i>	1	1,70
<i>Escherichia coli</i> + <i>Providencia rettgeri</i>	1	1,70
<i>Escherichia coli</i> + <i>Enterococcus faecalis</i> + <i>Aspergillus fumigatus</i>	1	1,70
<i>Escherichia coli</i> + <i>Vagococcus fluvialis</i> + <i>Proteus vulgaris</i>	1	1,70
<i>Escherichia coli</i> + <i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Proteus vulgaris</i>	1	1,70
<i>Escherichia coli</i> + <i>Aeromonas hydrophila</i> + <i>Proteus vulgaris</i> + <i>Aspergillus fumigatus</i>	1	1,70
<i>Escherichia coli</i> + <i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Vagococcus lutrae</i> + <i>Aspergillus niger</i>	1	1,70
Other associations**	15	25,42
Total Geral	59	100

697 * Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight = MALDI-TOF

698 ***Escherichia coli* + *Aspergillus niger*; *Escherichia coli* + *Aerococcus viridans*; *Escherichia coli* + *Aeromonas*
 699 *hydrophila*; *Escherichia coli* + *Carnobacterium divergens*; *Escherichia coli* + *Comamonas jangadensis*;
 700 *Escherichia coli* + *Lactococcus garvieae*; *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli* +
 701 *Raoultella ornithinolytica*; *Escherichia coli* + *Streptococcus uberis* + *Fusarium* spp.; *Escherichia coli* +
 702 *Enterococcus hirae* + *Streptococcus equinus*; *Escherichia coli* + *Streptococcus dysgalactiae* + *Aspergillus*
 703 *niger*; *Escherichia coli* + *Trueperella pyogenes* + *Aspergillus fumigatus*; *Escherichia coli* + *Pseudomonas*
 704 *monteilli* + *Aspergillus fumigatus*; *Escherichia coli* + *Enterococcus faecalis*; *Escherichia coli* + *Enterococcus*
 705 *faecium*.

706

707 Mild, moderate, and severe clinical severity scores of umbilical infections related-
 708 *E. coli* were observed in 32.2% (19/59), 23.7% (14/59), and 44.1% (26/59) of calves
 709 sampled, respectively.

710 Isolates were most susceptible to marbofloxacin (39/59=66.1%),
 711 amoxicillin/clavulanic acid (34/59=57.6%), and florfenicol (30/59=50.8%). Conversely,
 712 most isolates showed resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole (53/59=89.8%),
 713 ampicillin (35/59=59.3%), and tetracycline (34/59=57.6%) (Table 2). In addition,
 714 simultaneous resistance of isolates to ≥ 3 groups of antimicrobials was seen 94.1%
 715 (55/59) variants. Among these isolates, 8.5% (5/59), 6.8% (4/59), and 35.6% (21/59)
 716 were considered multidrug-resistant simultaneously to 4, 5, and ≥ 6 groups of
 717 antimicrobials studied, respectively.

718

719 Table 2. In vitro antimicrobial susceptibility test of 59 *E. coli* strains isolated from umbilical
 720 infections of neonatal calves. Brazil, 2020-2021.
 721

Groups	Antimicrobials	Susceptibility		
		S (%)	I (%)	R (%)
Aminoglycosides	gentamicin	28 (47.5)	16 (27.1)	15 (25.4)
Aminopenicillins	amoxicillin/clavulanic acid	34 (57.6)	8 (13.6)	17 (28.8)
	ampicillin	13 (22)	11 (18.7)	35 (59.3)
Amphenicols	florfenicol	30 (50.8)	7 (11.9)	22 (37.3)
Cephalosporins	ceftiofur	21 (35.6)	20 (33.9)	18 (30.5)
Fluoroquinolones	enrofloxacin	25 (42.4)	15 (25.4)	19 (32.2)
	marbofloxacin	39 (66.1)	7 (11.9)	13 (22.0)
Sulfonamides	trimethoprim/sulfamethoxazole	2 (3.4)	4 (6.8)	53 (89.8)
Tetracyclines	tetracycline	17 (28.8)	8 (13.6)	34 (57.6)

722 S=susceptible, I=intermediate, R=resistant

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

The ExPEC-related genes identification is summarized in Table 3. The predominant genes detected were related to serum resistance (*traT*, 42/59=72.2%; *ompT*, 35/59=59.3%, *kpsMTII*, 10/59=17%), invasins (*ibe*, 11/59=18.6%), siderophores (*iucD*, 9/59=15.3%; *iroN*, 8/59=13.6%), and adhesins (*papA*, 8/59=13.6%; *papC*, 15/59=9.6%).

A variety of combinations between genes studied was seen, with the most common association observed between *ompT* and *traT* (6/59=10.2%) (Table 4). The association between *ompT* and *traT* was predominant among calves with severity scores 1 (4/19=23.5%) and 2 (2/14=14.3%) and revealed a significant association ($p<0.0001$), whereas *iroN* and *traT* (2/26=8%), and *ibeA*, *ompT*, and *traT* co-occurrence (2/26=8%) were the most common associations in cases with score 3.

736 Table 3. Absolut (N/total) and relative (%) frequencies of ExPEC-related genes of 59 *E.*
 737 *coli* isolated from umbilical infections in neonatal calves. Brazil, 2020-2021.

Virulence factors	Genes				<i>p</i> -value
Adesins/fimbriae	<i>papA</i> 13.6% (8/59)	<i>papC</i> 15.3% (9/59)	<i>afaBC</i> 0% (0/59)	<i>sfa/focDE</i> 0% (0/59)	1.0000
Toxins	<i>hlyA</i> 8.5% (5/59)	<i>sat</i> 0% (0/59)	<i>cnf</i> 8.5% (5/59)	<i>cdt</i> 8,5% (5/59)	1.0000
Siderophores	<i>iroN</i> 13.6% (8/59)	<i>irp2</i> 13.6% (8/59)	<i>iucD</i> 15.3% (9/59)	<i>ireA</i> 0% (0/59)	0.9545
Invasins	<i>ibeA</i> 18.6% (11/59)				-
Serum resistance	<i>kpsMTII</i> 17.0% ^a (10/59)	<i>ompT</i> 59.3% ^b (35/59)	<i>traT</i> 72.2% ^b (42/59)		<0.0001

738 *papA*=P fimbriae; *papC*= P fimbriae; *afaBC*=Afa/Dr adhesin; *sfa/focDE*=S/F1C fimbriae; *hlyA*=hemolisin;
 739 *sat*=secreted autotransporter toxin; *cnf*=cytotoxic necrotizing factor; *cdt*=cytolethal distending toxin;
 740 *iroN*=salmochelin; *irp2*=yersiniabactin; *iucD*=aerobactin; *ireA*=siderophore receptor; *ibeA*=invasion of brain
 741 endothelium; *ompT*=outer membrane protease T; *traT*=surface exclusion protein; *kpsMTII*=group II capsule.
 742 N=number; %=percentage

743 Table 4. Distribution of ExPEC-related genes profiles identified in 59 *E. coli* isolated from
 744 neonatal calves with different clinical severity scores of umbilical infections. Brazil, 2020-
 745 2021.

Severity scores (N of isolates)	ExPEC genes profiles	N	Frequency (%)
1 (19 isolates)	<i>ompT, traT</i>	4	23.5
	<i>traT</i>	2	11.8
	<i>ompT</i>	2	11.8
	<i>cdt, irp2, iucD, ibe20, ompT, traT, kpsMTII</i>	1	5.9
	<i>papA, papC, hlyA, cnf1, ompT, traT</i>	1	5.9
	<i>papA, papC, ompT, traT</i>	1	5.9
	<i>papC, traT, kpsMTII</i>	1	5.9
	<i>iucD, ompT, traT</i>	1	5.9
	<i>iucD, traT</i>	1	5.9
	<i>iroN, traT</i>	1	5.9
	<i>irp2, ompT</i>	1	5.9
	<i>iroN</i>	1	5.9
	2 (14 isolates)	<i>ompT, traT</i>	2
<i>iroN</i>		1	7.1
<i>papA, papC, hlyA, cnf1, irp2, ompT, traT, kpsMTII</i>		1	7.1
<i>cdt, ompT, traT</i>		1	7.1
<i>irp2, ompT, kpsMTII</i>		1	7.1
<i>iroN, iucD, ompT</i>		1	7.1
<i>ompT, traT</i>		1	7.1
<i>ibeA, ompT</i>		1	7.1
<i>ibeA, traT</i>		1	7.1
<i>iucD, traT</i>		1	7.1
<i>irp2, traT</i>		1	7.1
<i>ibeA</i>		1	7.1
<i>traT</i>		1	7.1
3 (26 isolates)	<i>iroN, traT</i>	2	8.0
	<i>traT</i>	2	8.0
	<i>ibeA, ompT, traT</i>	2	8.0
	<i>ibeA, ompT</i>	1	4.0
	<i>cdt, ibeA, traT</i>	1	4.0
	<i>cdt, irp2, iucD, ibeA, ompT, traT, kpsMTIII</i>	1	4.0
	<i>cdt, ompT, traT</i>	1	4.0
	<i>iroN, ompT, traT</i>	1	4.0
	<i>irp2, ibeA, ompT, traT</i>	1	4.0
	<i>irp2, ibeA, traT</i>	1	4.0
	<i>iucD</i>	1	4.0
	<i>iucD, ompT, traT</i>	1	4.0
	<i>ompT</i>	1	4.0
	<i>ompT, kpsMTIII</i>	1	4.0
	<i>ompT, traT</i>	1	4.0
	<i>papA, hlyA, cnf1, ompT, traT, kpsMTIII</i>	1	4.0
	<i>papA, papC, hlyA, cnf1, ompT, traT</i>	1	4.0
	<i>papA, papC, hlyA, cnf1, ompT, traT, kpsMTII</i>	1	4.0
	<i>papA, papC, iroN, ompT, traT</i>	1	4.0
<i>papA, papC, iucD, ompT, traT, kpsMTII</i>	1	4.0	
<i>papC, traT, kpsMTIII</i>	1	4.0	
<i>traT, kpsMTII</i>	1	4.0	

746 N=number; %=percentage

747 Among 150 neonatal calves sampled here with umbilical infections, ~40% had
748 isolation of *E. coli* in pure culture (45.8%= 27/59) or coinfections (54.2%=32/59). This
749 finding is consistent with similar studies in which the pathogen has been reported as a
750 primary and predominant agent of umbilical infections in neonatal calves, isolated among
751 34% of cases in Iran (Faradonbeh and Faradonbeh, 2016) and 22.5% in Colombia
752 (Cardona, 2011). In addition, high coinfection of *E. coli* with other enterobacteria species
753 was seen among calves sampled, indicating the predominance of these group of agents
754 with well-known opportunistic behavior, which infect the umbilical cord of neonatal calves
755 from the soil, feces, organic matter, water, or utensils contaminated from own
756 environment of farms (Faradonbeh and Faradonbeh, 2016).

757 Likewise clinical bovine mastitis-related *E. coli* (Guerra et al., 2019, 2020), some
758 studies have proposed standardization of clinical severity scores of umbilical infections
759 in neonatal calves (Steerforth and Winden, 2018; Hintz et al., 2019). Among 59 *E. coli*,
760 isolates of umbilical infections in neonatal cases were observed to have a predominance
761 of score 3 or severe, which hypothetically could be associated with the diversity of VF of
762 the pathogen. Nevertheless, to date, the specific VF-related pathogens involved in
763 umbilical infections of neonatal calves, particularly *E. coli* variants, have not been
764 thoroughly elucidated, as well as the influence of these virulence mechanisms on the
765 severity scores of umbilical disorders, a fact that represented the major motivation of the
766 current study.

767 Marbofloxacin (66.1%), amoxicillin/clavulanic acid (57.6%), and florfenicol
768 (50.8%) showed only a moderate efficacy among *E. coli* isolates. In turn, a high multidrug
769 resistance of isolates (94.1%) was observed among all *E. coli* studied, with a wide variety
770 of resistance profiles, particularly to trimethoprim/sulfamethoxazole (89.8%), ampicillin
771 (59.3%), and tetracycline (57.6%). This result agrees with similar studies involving
772 umbilical infections in neonatal calves (Waade et al., 2021) and is relevant to human
773 health (Bélanger et al., 2011), due to the global emergence of bacterial multidrug
774 resistance (Marston et al., 2016). In this regard, the resistance of *E. coli* isolates to
775 trimethoprim/sulfamethoxazole, ampicillin, and tetracycline was expected because these
776 antimicrobials have been used for decades in a wide variety of treatments for different
777 diseases in domestic ruminants, reinforcing that therapy approaches should be based, if
778 possible, on previous results of in vitro antimicrobial susceptibility testing (Giguère et al.,
779 2013).

780 A great variety of clinical manifestations has been associated with ExPEC
781 variants recovered from humans (Bélanger et al., 2011) and animal species (Siqueira et
782 al., 2009), including domestic ruminants (Guerra et al., 2020). The virulence of extra-
783 intestinal *E. coli* isolates from human and animal origin is characterized by a complexity

784 of properties, e.g., endo- and exotoxin production, adherence of the pathogen to host
785 cells, resistance to serum immune mechanisms, and ability to acquire exogenous iron
786 (Bélanger et al., 2011; Mainil, 2013).

787 Fimbriae and adhesins are protein structures that protrude from bacterial
788 surfaces, responsible for the adherence of *E. coli* to host cells (Kline et al., 2009). *pap*
789 genes, which encode major subunit *papA* (13.9%) and minor subunit *papC* (15.3%), were
790 detected in our *E. coli* isolated from neonatal calves, indicating that these fimbriae may
791 represent a play a role in the adhesion of pathogenic isolates to cells through the
792 umbilical tract. Among domestic animals, genes *papC* and *papGIII* have been identified
793 in *E. coli* isolated from canine pyometra and urinary tract infections (Siqueira et al., 2009),
794 whereas these fimbriae have not been identified in clinical mammary infections-related
795 *E. coli* (Guerra et al., 2020).

796 *cnf* genes encodes proteins known as a cytotoxic necrotizing factor (*cnf*) that
797 promotes reorganization of the outer structure of actin inducing a necrosis process in
798 host tissues (Mainil, 2013). *cnf* has been described mainly in extra-intestinal disorders,
799 particularly genital and urinary tract infections in humans (Toth et al., 2003) and
800 companion animals (Siqueira et al., 2009). In this regard, cytolethal distending toxin
801 (CDT) is another toxin produced by some bacteria, encoded by *cdt* gene, which induces
802 a DNA damage. This toxin has been reported in enteric and extra-enteric diseases in
803 human patients (Fais et al., 2016). *cnf* (8.5%) and *cdt* (8.5%) genes were identified
804 among *E. coli* isolated from neonatal calves sampled, besides no clear evidence of a
805 primary action of these toxins on the establishment of umbilical disorders in neonatal
806 calves.

807 Most bacteria use iron as an essential element for general metabolism. Low
808 availability of this ion requires that bacterium use virulence mechanisms for iron uptake
809 (siderophores), which determine the hemolysis effect (hemolysins) and liberation of iron
810 in tissues and blood circulation (Mainil, 2013). The genes *hlyA* (8.5%) that encodes
811 hemolysin, as well as *iucD* (15.3%), *iroN* (13.6%), and *irp2* (13.6%) genes related to
812 siderophores-production, were identified among 59 *E. coli* isolated from neonatal calves
813 with umbilical infections. Some studies focused on extra-intestinal clinical disorders in
814 companion animals (Siqueira et al., 2009) and cattle have revealed a variable occurrence
815 of *hlyA*, *iucD*, *irp2*, and *iroN* (Fairbrother et al., 2015; Guerra et al., 2020). Despite no
816 clear evidence of hemolysins and siderophores as primary virulence mechanisms of
817 ExPEC variants to induce umbilical infections in neonatal calves, they may provide
818 additional virulence properties that contribute to the pathogenicity of the *E. coli* in the
819 umbilical tract.

820 The ability of some gram-negative bacteria to survive in the blood to immune
821 response may be attributed to the surface proteins, polysaccharide capsule, and
822 lipopolysaccharide of the membrane (LPS) (Proft and Baker, 2009). These structures
823 confer protection to the pathogen to the complement system, which is considered a
824 serum factor related to resistance against bacterial multiplication (Miajlovic and Smith,
825 2014). Some *E. coli* strains harbor the *traT* gene that interacts with specific components
826 of the complement system, avoiding bacterial lysis in blood circulation (Johnson and
827 Stell, 2000). Similar to *traT*, the *ompT* gene has also been associated with the serum
828 resistance of bacteria. A study conducted with 114 clinical cases of bovine mastitis
829 related-*E. coli* revealed a high occurrence of *traT* (81.6%) and *ompT* (35.1%) genes
830 (Guerra et al., 2020). In the current study, *traT* (72.2%) and *ompT* (59.3%) genes were
831 also detected in high frequency among *E. coli* strains isolated from umbilical disorders in
832 neonatal calves, showing a statistical association with severity scores 1 and 2,
833 suggesting that these genes could be used as biomarkers to investigate clinical severity
834 scores of umbilical infections.

835 Invasins consist of thin protein filaments located on the surface of *E. coli* strains,
836 which favor the invasion of the pathogen into host cells (McCulloch and Mamizuca,
837 2015). In the current study, 18.6% of *E. coli* strains had gene detection of the invasin
838 *ibeA*. Besides the recent identification of *ibeA* in *E. coli* variants recovered from clinical
839 mammary infections of cows (Guerra et al., 2020), the role of invasins in the
840 pathogenicity of *E. coli* isolated from infectious omphalopathies in neonatal calves
841 remains poorly understood.

842 Brazil possesses one of the largest cattle herds worldwide (up to 220 million
843 head) (IBGE, 2020), with the birth of approximately 50 million calves every year, although
844 it is estimated that 7% of calves died until weaning. Umbilical infections represent a major
845 cause of neonatal disorders, particularly by *E. coli* variants (Cardona et al., 2011;
846 Faradonbeh and Faradonbeh, 2016), which contribute significantly to the mortality rates
847 of calves (Windeyer et al., 2014; Bozukluan et al., 2018). Therefore, given the high
848 prevalence and significant losses related to umbilical infections in neonatal calves
849 (Bozukluan et al., 2018), it is necessary to adopt in farms sampled systematic measures
850 to prevent and control umbilical disorders, particularly proper umbilical antisepsis of
851 neonatal calves, adequate ingestion of colostrum at first hours after birth, and removal
852 of feces and organic matter in the environment of neonatal calves (Salci et al., 2017).

853 Besides a significant difference in calves sampled between scores 1 and 2 of
854 clinical severity of umbilical infections, and detection of genes *ompT* and *traT* related to
855 serum resistance, the majority of calves sampled revealed score 3 (severe). The lack of
856 association of a panel of ExPEC genes studied with clinical scores of umbilical infections

857 may be credited to insufficient statistical power, or other extra-intestinal genes non-
858 studied, which in addition to no consistent information/missing data regarding the
859 outcome of most calves sampled may be considered limitations of the current study.
860 Nonetheless, the panel of 16 genes studied related to ExPEC infections has been
861 investigated for the first time, to our knowledge, among *E. coli* isolates obtained from
862 neonatal calves, where clinical severity scores of umbilical infections were assessed.

863 Overall, the high occurrence of *E. coli* in sampled calves highlights the role of
864 these enterobacteria on the etiology of omphalopathies in neonatal calves. *traT* and
865 *ompT* were the predominant extra-enteric genes detected, particularly among neonatal
866 calves with scores 1 and 2 of clinical severity of umbilical infections, suggesting that
867 these genes related to serum resistance could be used as biomarkers to investigate
868 ExPEC variants in umbilical disorders of neonatal calves. The high multidrug resistance
869 of isolates reinforces the need for rational use of antimicrobials in therapeutic
870 approaches to umbilical infections. Our results contribute to the etiological
871 characterization, clinical severity scores investigation, antimicrobial resistance pattern,
872 and virulence mechanisms of ExPEC variants involved in umbilical infections of calves.

873

874 **ETHICS COMMITTEE**

875 This study was performed in agreement with the Ethics Committee in Animal Use
876 guidelines, from the School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State
877 University - UNESP, Botucatu, SP, Brazil, protocol number 0129/2020.

878

879 **ACKNOWLEDGMENTS**

880 This study was supported by the Coordination for the Improvement of Higher
881 Education Personnel – Brazil (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
882 Superior, CAPES) – Financing Code 001. We thank also the National Council for
883 Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento
884 Científico e Tecnológico, CNPq), Brazil, for research productivity fellowship (PQ) given
885 to Márcio Garcia Ribeiro.

886

887 **CONFLICTS OF INTEREST**

888 The authors declare that there are no conflicts of interest.

889

890 **REFERÊNCIAS**

891

892 Barreiro JR, Ferreira CR, Sanvido GB, Kostrzewa M, Maier T, Wegemann B, Böttcher
893 V, Eberlin MN, dos Santos MV. 2010. Short communication: Identification of
894 subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser

- 895 desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Dairy Sci.* 93(12):5661-7.
896 doi: 10.3168/jds.2010-3614.
- 897 Bélanger, L., A. Garenaux, J. Harel, M. Boulianne, E. Nadeau, and C. M. Dozois. 2011.
898 *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human
899 extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62:1–10.
900 <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00797.x>.
- 901 Bozukluhan, K., Merhan, O., Ogun, M., Kurt, B., Cihan, M., Erkilic, E. E., Gokce, G.,
902 Aydin, U., & Ozcan, A. 2018. Investigation of haptoglobin, serum amyloid A, and
903 some biochemical parameters in calves with omphalitis. *Veterinary world*, 11(8),
904 1055–1058. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1055-1058>.
- 905 Cardona Á. J., Álvarez P. J., & Arrieta B. G. 2011. Aislamiento e identificación de agentes
906 bacterianos productores de onfalitis en terneros del departamento de córdoba.
907 *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica.* 14 (2): 95 – 99.
- 908 Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI. 2020a. Performance Standards for
909 Antimicrobial Disk and dilution Susceptibility Test for Bacteria isolated from Animals
910 (CLSI VET 015). 5th edition. Wayne, PA. 250p.
- 911 Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI. 2020b. Performance standards of
912 Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th Edition. Wayne, PA. 332p.
- 913 Croxen, M. A., R. J. Law, R. Scholz, K. M. Keeney, M. Wlodar-ska, and B. Finlay. 2013.
914 Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin.*
915 *Microbiol. Rev.* 26:822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>.
- 916 Croxen, M., Finlay, B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity.
917 *Nat Rev Microbiol* 8, 26–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>.
- 918 Fairbrother, J. H., S. Dufour, J. M. Fairbrother, D. Francoz, E. Nadeau, and S. Messier.
919 2015. Characterization of persistent and transient *Escherichia coli* isolates
920 recovered from clinical mastitis episodes in dairy cows. *Vet. Microbiol.* 176:126–
921 133. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.12.025>.
- 922 Faís, T., Delmas, J., Serres, A., Bonnet, R., & Dalmasso, G. 2016. Impact of CDT Toxin
923 on Human Diseases. *Toxins*, 8(7), 220. <https://doi.org/10.3390/toxins8070220>.
- 924 Faradonbeh, Y. K. & Faradonbeh, M. K. 2016. Evaluate the risk factors umbilical cord
925 bacterial infection in calves in Shahrekord city. *Journal of Entomology and Zoology*
926 *Studies*, 4(2):162-166.
- 927 Gharieb R, Fawzi E, Elsohaby I. Antibiogram, virulotyping and genetic diversity of
928 *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars isolated from diarrheic calves and calf
929 handlers. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2019 Dec;67:101367. doi:
930 10.1016/j.cimid.2019.101367.
- 931 Giguère, S., Prescott, J.F.; Dowling, P.M. 2013. Antimicrobial Therapy in Veterinary
932 Medicine. Pages 26-42. 5th ed. Wiley Blackwell.
- 933 Gonçalves JL, Tomazi T, Barreiro JR, Braga PA, Ferreira CR, Araújo Junior JP, Eberlin
934 MN, dos Santos MV. 2014. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from
935 bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time
936 of flight mass spectrometry. *Vet Microbiol.* 17;173(1-2):147-51. doi:
937 10.1016/j.vetmic.2014.06.028. Epub 2014 Jul 7.
- 938 Guerra, S. T., Orsi, H., Joaquim, S. F., Guimaraes, F. F., Lopes, B. C., Dalanezi, F. M.,
939 et al. 2020. Short Communication: Investigation of Extra-Intestinal Pathogenic
940 *Escherichia Coli* Virulence Genes, Bacterial Motility, and Multidrug Resistance
941 Pattern of Strains Isolated From Dairy Cows With Different Severity Scores of
942 Clinical Mastitis. *Journal of Dairy Science*, v. 103, p. 3606–3614, 2020.
943 <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17477>
- 944 Hintz, L. P.; Bertagnon, H. G.; Oliveira L. J. C. 2019. Avaliação de diferentes protocolos
945 preventivos para onfalopatias em bovinos de corte recém-nascidos. *PUBVET*,
946 13:166.
- 947 IBGE. 2020. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária
948 Municipal. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. v. 48, Rio de Janeiro,
949 Brazil.

- 950 Johnson, J. R., and A. Stell. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli*
951 strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise.
952 *J. Infect. Dis.* 181:261–272. <https://doi.org/10.1086/315217>.
- 953 Kline, K. A., S. Fälker, S. Dahlberg, S. Normark, and B. Henriques-Normark. 2009.
954 Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 5:580–592. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.011>.
- 955
956 Mainil J. 2013. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet Immunol Immunopathol.* 15;152(1-
957 2):2-12. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.032.
- 958 Manges AR, Johnson JR. Reservoirs of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*.
959 *Microbiol Spectr.* 2015 Oct;3(5). doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0006-2012.
- 960 Marston, H. D., D. M. Dixon, J. M. Knisely, T. N. Palmore, and A.S. Fauci. 2016.
961 Antimicrobial resistance. *JAMA* 316:1193–1204.
962 <https://doi.org/10.1001/jama.2016.11764>.
- 963 McCulloch, H., and E. M. Mamizuca. 2015. *Staphylococcus aureus*. Pages 179–188 in
964 *Microbiologia*. 6th ed. L. R. Trabulsi and F. Alterthum, ed. Atheneu, São Paulo,
965 Brazil.
- 966 Miajlovic, H., and S. Smith. 2014. Bacterial self-defence: How *Escherichia coli* evades
967 serum killing. *FEMS Microbiol. Lett.* 354:1–9. [https://doi.org/10.1111/1574-
968 6968.12419](https://doi.org/10.1111/1574-6968.12419).
- 969 Murray, C.J.L., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L. 2022. Global burden of bacterial
970 antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet.* 19;[e-pub].
971 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- 972 Proft T, Baker EN. 2009. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure,
973 assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci.* 66(4):613-35. doi:
974 10.1007/s00018-008-8477-4.
- 975 Quinn, P. J.; Markey, B. K.; Leonard, F. C.; Fitzpatrick, E. S.; Fanning, S.; Hartigan, P.
976 J. 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 2nd edn. Wiley-Blackwell,
977 UK. 334–341.
- 978 Salci H, Ozdemir Salci E.S, Ozakin C, Seyrek Intas K. A brief study on hematological,
979 sero-biochemical and microbiological results of umbilical lesions in calves. *Inter. J.*
980 *Vet. Sci.* 2017;6:86–89.
- 981 Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M.,
982 Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. 2019. Virulence factors, prevalence and
983 potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from
984 different sources: recent reports. *Gut pathogens,* 11:10.
985 <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>.
- 986 Schönecker L, Schnyder P, Schüpbach-Regula G, Meylan M, Overesch G. 2020.
987 Prevalence and antimicrobial resistance of opportunistic pathogens associated with
988 bovine respiratory disease isolated from nasopharyngeal swabs of veal calves in
989 Switzerland. *Prev Vet Med.* 185:105182. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105182.
- 990 Siqueira AK, Ribeiro MG, Leite Dda S, Tiba MR, Moura Cd, Lopes MD, Prestes NC,
991 Salerno T, Silva AV. 2009. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from
992 urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Res Vet*
993 *Sci.* 86(2):206-10. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.07.018.
- 994 Steerforth DD, Van Winden S. 2018. Development of clinical sign-based scoring system
995 for assessment of omphalitis in neonatal calves. *Vet Rec.* 2;182(19):549. doi:
996 10.1136/vr.104213.
- 997 Tóth I, Schmidt H, Dow M, Malik A, Oswald E, Nagy B. 2003. Transduction of porcine
998 enteropathogenic *Escherichia coli* with a derivative of a shiga toxin 2-encoding
999 bacteriophage in a porcine ligated ileal loop system. *Appl Environ Microbiol.*
1000 69(12):7242-7. doi: 10.1128/AEM.69.12.7242-7247.2003.
- 1001 Van Bost, S.; Mainil, J. 2003. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des
1002 souches invasives d' *Escherichia coli*: III) Production de toxines. *Annales Médecine*
1003 *Vétérinaire,* 147:327–342.

- 1004 Waade J, Seibt U, Honscha W, et al. 2021. Multidrug-resistant enterobacteria in newborn
1005 dairy calves in Germany. *PloS one*. 16(3):e0248291. doi:
1006 10.1371/journal.pone.0248291.
- 1007 Windeyer MC, Leslie KE, Godden SM, Hodgins DC, Lissemore KD, LeBlanc SJ. 2014.
1008 Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to
1009 3 months of age. *Prev Vet Med*. Feb 1;113(2):231-40. doi:
1010 10.1016/j.prevetmed.2013.10.019.
- 1011
- 1012

1013 **ARTIGO 2**1014 **Caracterização microbiológica por espectrometria de massas de isolados de**
1015 **infecções umbilicais em bezerros neonatos e perfil de sensibilidade microbiana**
1016 ***in vitro****
10171018 **Lorrayne de Souza A. Martins,¹ Rodrigo G. Motta,² Antônio C. Martinez,² Alana L.**
1019 **Oliveira,³ Sandra de Moraes G. Bosco,³ Fernando José P. Listoni,¹ Márcio G.**
1020 **Ribeiro^{1*}**
10211022 ¹Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina
1023 Veterinária e Zootecnia, FMVZ - UNESP, Botucatu, SP, 18618 681, Brasil.1024 ²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Umuarama,
1025 PR, 87507 190, Brasil.1026 ³Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP
1027 16818 689, Brasil.

1028

1029

1030 **RESUMO:** As infecções umbilicais representam causa significativa de prejuízos aos
1031 produtores devido às complicações com a disseminação de patógenos, causando
1032 poliartrite, pneumonia, abscessos em órgãos e sepse, que estão relacionadas a
1033 mortalidade e aumento na reposição de animais. As onfalopatias se caracterizam pela
1034 complexidade etiológica, particularmente de origem bacteriana, por vezes envolvendo
1035 isolados multirresistentes aos antimicrobianos. No entanto, a maioria dos estudos com
1036 a etiologia microbiana de infecções umbilicais em bezerros têm realizado o diagnóstico
1037 com base em métodos fenotípicos convencionais. Neste cenário, o presente estudo
1038 investigou a etiologia microbiana de 150 casos de infecções umbilicais em bezerros
1039 neonatos (≤ 30 dias de idade) com diagnóstico em nível de espécies dos patógenos
1040 baseado na espectrometria de massas, em animais nos quais os escores de gravidade
1041 clínica das onfalopatias (1 ou leve, 2 ou moderada e 3 ou grave) foram avaliados. Ainda,
1042 foi investigado o perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* dos isolados. O isolamento
1043 microbiano foi obtido em 94,7% (142/150) dos animais, enquanto em 5,3 (8/150) não
1044 foram isolados micro-organismos. Do total de animais, 66% (99/150) apresentavam
1045 exclusivamente infecções umbilicais, enquanto 34% (51/150) tinham outros sinais
1046 clínicos associados ou complicações, incluindo artrite, pneumonia, linfadenite, hérnia e
1047 sinais neurológicos. Foi possível obter informações de complicações dos casos das
1048 infecções umbilicais em 14% (21/150) dos animais, dos quais 19,1% (4/21)
1049 desenvolveram poliartrite, 9,5% (2/21) emagrecimento progressivo e 28,6% (6/21)
1050 evoluíram para óbito. Foram colhidas amostras de bezerros com escores de gravidade
1051 1, 2 e 3 em, respectivamente, 34% (51/150), 34% (51/150) e 32% (48/150) animais.
1052 Foram obtidos 190 isolados em cultura pura (72/142=50,7%) ou em associações
1053 (70/142=49,3%). *E. coli* (n=59) foi o principal micro-organismo isolado em cultura pura
1054 (27/72=37,5%) ou em associações (32/70=44,4%), principalmente com outras
1055 enterobactérias, com escores de gravidade das infecções umbilicais equivalentes entre
1056 os níveis 1, 2 e 3. Em menor frequência foram isolados fungos e leveduras
1057 (41/150=27,3%), e espécies de estafilococos (19/190=10%), *Pseudomonas*
1058 (13/190=6,8%), estreptococos (7/190=3,7%), Enterococcaceae (8/190=4,2%) e
1059 actinomicetos (7/190=3,7%). Sensibilidade moderada dos isolados foi observada para o
1060 marbofloxacino (128/190=67,4%), amoxicilina/ácido clavulânico (121/190=63,7%),
1061 gentamicina (112/190=58,9%) e florfenicol (106/190=55,8%). Em contraste, os isolados
1062 apresentaram maior resistência para sulfametoxazol/trimetoprim (159/190=83,7%),
1063 ampicilina (114/190=60%) e tetraciclina (101/151=53,1%). A multirresistência ≥ 3 dos

*Artigo formatado conforme as normas da revista Brazilian Journal of Microbiology

1064 diferentes grupos de antimicrobianos utilizados foi observada em 83,7% (n=159/190)
1065 dos isolados. *Raoutella ornithinolytica*, *Siccibacter turicensis*, *Bacillus licheniformes*,
1066 *Carnobacterium divergens*, *Comamonas jangadnsis*, *Desemzia incerta*, *Helcococcus*
1067 *ovis*, *Kocuria marina*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus garveae*, *Leuconostoc lactis* e
1068 *Vagococcus fluvialis*, , *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium* spp.,
1069 *Candida catenulata*, e *Candida parapsilosis* foram descritos pela primeira vez, na
1070 literatura consultada, como agentes primários de infecções umbilicais de bezerros com
1071 até 30 dias de idade. Grande complexidade etiológica foi identificada em infecções
1072 umbilicais em bezerros neonatos, com predomínio de *E. coli* e outras bactérias de
1073 origem ambiental, requerendo a adoção de ações sistemáticas para a profilaxia das
1074 onfalopatias nas fazendas amostradas. Ainda, a elevada multirresistência dos isolados
1075 de origem bacteriana foi observada diante de antimicrobianos convencionais,
1076 reforçando a necessidade do uso racional de fármacos nas abordagens terapêuticas em
1077 bovinos.

1078
1079 **PALAVRAS-CHAVE:** doenças neonatais em bezerros, onfalopatias infecciosas,
1080 MALDI-TOF MS, multirresistência bacteriana

1081
1082

1083 **ABSTRACT:** The umbilical infections pose as significant causes of losses to dairy
1084 farmers due to complications secondary to the dissemination of the pathogens, causing
1085 polyarthritis, pneumonia, abscesses in organs, and sepsis, which have been related to
1086 mortality and increase in animal replacement. High etiological complexity has been seen
1087 in omphalopathies, particularly from the bacterial origin, which involves multidrug-
1088 resistant isolates. Nonetheless, most studies focused on the etiology of umbilical
1089 infections in neonatal calves based on diagnosis in conventional phenotypic methods. In
1090 this scenario, the present study investigated the etiology of 150 umbilical infections in
1091 neonatal calves (≤ 30 days of age), where diagnosis in species level of pathogens was
1092 based on mass spectrometry, among animals where severity scores of clinical severities
1093 of umbilical infections were assessed (score 1 or mild, 2 or moderate, and 3 or severe).
1094 In addition, *in vitro* susceptibility testing pattern of the isolates was evaluated as well.
1095 Isolation of micro-organisms was obtained in 94.7% (142/150) of animals, whereas
1096 among 5.3 (8/150) samples no microbial isolation was found. Of 150 animals, 66%
1097 (99/150) showed exclusively umbilical infections, whereas 34% (51/150) had other signs
1098 associated with clinical complications, including arthritis, pneumonia, lymphadenitis,
1099 hernia, and neurologic disorders. Data of clinical complications from umbilical infections
1100 were obtained from 14% (21/150) calves, of which 19.1% (4/21) developed polyarthritis,
1101 9.5% (2/21) progressive weight loss, and 28.6% (6/21) died. Samples were collected
1102 from calves presenting umbilical infections with severity scores 1, 2, and 3, in 34%
1103 (51/150), 34% (51/150), and 32% (48/150) of animals, respectively. One hundred ninety
1104 isolates were obtained in pure culture (72/142=50.7%) or coinfections (70/142=49.3%).
1105 *E. coli* (n=59) represented the main agent isolated among calves sampled, in pure culture
1106 (27/72=37.5%) or concomitant infections (32/70=44.4%), particularly with enterobacterial
1107 species, showing similar severity scores of three levels of umbilical infections. Fungi and
1108 yeasts (41/150=27.3%), as well as staphylococci (19/190=10%), *Pseudomonas*
1109 (13/190=6,8%), streptococci (7/190=3.7%), Enterococcaceae (8/190=4,2%), and
1110 actinomycetes (7/190=3,7%) species were isolated with a minor frequency. Most isolates
1111 revealed moderate *in vitro* susceptibility to marbofloxacin (128/190=67.4%),
1112 amoxicillin/clavulanic acid (121/190=63.7%), gentamicin (112/190=58.9%), and
1113 florfenicol (106/190=55.8%). In turn, high resistance of isolates was seen to
1114 sulfamethoxazole/trimethoprim (159/190=83.7%), ampicillin (114/190=60%), and
1115 tetracycline (101/151=53.1%). Multidrug resistance to ≥ 3 different groups of
1116 antimicrobials studied was found in 83.7% (n=159/190) isolates. To our knowledge,
1117 *Raoutella ornithinolytica*, *Siccibacter turicensis*, *Bacillus licheniformes*, *Carnobacterium*
1118 *divergens*, *Comamonas jangadnsis*, *Desemzia incerta*, *Helcococcus ovis*, *Kocuria*

1119 *marina*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus garveae*, *Leuconostoc lactis* e *Vagococcus*
1120 *fluvialis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium* spp., *Candida catenulata*,
1121 e *Candida parapsilosis* were described for the first time as primary agents of umbilical
1122 infections of calves until 30 days-of-age. A high etiological complexity was identified in
1123 diseased calves sampled, with a predominance of *E. coli* and other bacteria from the
1124 environmental nature, which requires the adoption of systematic measures to control
1125 umbilical infections in neonatal calves among farms sampled. Furthermore, high *in vitro*
1126 multidrug resistance of isolates was seen to conventional drugs, highlighting the need
1127 for proper use of antimicrobials among bovine therapeutic approaches.

1128
1129 **KEYWORD:** neonatal diseases in calves, infectious omphalopathies, MALDI-TOF MS,
1130 bacterial multidrug-resistance

1131

1132

1133 **INTRODUÇÃO**

1134 Os primeiros meses de idade são considerados críticos na criação de bezerros,
1135 devido a certa imaturidade do sistema imunológico, que favorece o estabelecimento de
1136 infecções entéricas, pulmonares, articulares e umbilicais (Windeyer et al., 2014).

1137 As infecções umbilicais representam entre 28 e 42% das afecções clínicas em
1138 bezerros com até 30 dias de idade destinados a produção de leite, e correspondem a
1139 aproximadamente 10% de todas as causas de mortalidade em animais com até oito
1140 meses de idade, causando prejuízos significativos aos produtores relacionados ao
1141 descarte precoce, reposição de animais e mortalidade neonatal (Reis et al., 2009,
1142 Windeyer et al., 2014, Faradonbeh e Faradonbeh, 2016).

1143 As onfalopatias infecciosas podem evoluir para a disseminação de micro-
1144 organismos pelos vasos e artérias da região umbilical ou pelo úraco, desenvolvendo
1145 infecções secundárias como artrite, meningite, abscessos em órgãos, pneumonia,
1146 endocardite e septicemia, por vezes com evolução fatal (Beam et al., 2009; Blowey,
1147 Weaver, 2011).

1148 As infecções umbilicais em bezerros caracterizam-se por etiologia complexa,
1149 principalmente de origem bacteriana (Cardona et al. 2011; Salci et al., 2017). Grande
1150 complexidade de patógenos já foram identificados em casos de infecções umbilicais em
1151 bezerros, com predomínio de enterobactérias (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*,
1152 *Enterobacter* spp. e *Proteus* spp.), estafilococos, estreptococos, *Pseudomonas*
1153 *aeruginosa* e actinomicetos (*Nocardia* spp. e *Trueperella pyogenes*). Entretanto, nestes
1154 estudos, o diagnóstico tem sido baseado majoritariamente com base em métodos de
1155 identificação fenotípica dos micro-organismos (Cardona et al., 2011). Ainda, tem-se
1156 proposto padronizar os escores de gravidade clínica das infecções umbilicais em
1157 bezerros (Steerforth e Windem, 2018; Hintz et al., 2019) embora, em tais estudos, a
1158 associação entre os escores de gravidade e os agentes causais das infecções umbilicais
1159 tenham merecido pouca atenção.

1160 A multirresistência bacteriana aos antimicrobianos em humanos e em animais é
1161 considerada preocupação emergente, de ordem global (Murray et al., 2022), incluindo
1162 por micro-organismos isolados de infecções bezerros, que dificultam sobremaneira a
1163 abordagem terapêutica dos casos (Schönecker et al., 2020).

1164 Neste cenário, o presente estudo investigou a prevalência de patógenos
1165 envolvidos em infecções umbilicais em bezerros leiteiros com até 30 dias de idade,
1166 diagnosticados por espectrometria de massas, os escores de gravidade clínicas das
1167 onfalopatias, bem como a presença de resistência múltipla dos isolados aos
1168 antimicrobianos.

1169

1170 **MATERIAIS E MÉTODOS**

1171

1172 **Comissão de Ética**

1173 O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais
1174 (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP), sob número 0129/2020.

1175

1176 **Delineamento amostral**

1177 Para o presente estudo foram coletados suabes da secreção de umbigo de
1178 bezerros naturalmente infectados com sinais de infecção umbilical, provenientes de
1179 rebanhos leiteiros situados nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Paraná.

1180 Os fatores de inclusão dos bezerros e propriedades utilizadas no estudo foram:
1181 1) presença de piquetes maternidade, 2) não realização de tratamento com
1182 antimicrobianos sete dias anteriores a colheita das amostras umbilicais, 3) idade
1183 máxima de 30 dias.

1184 Foram amostrados 150 bezerros das raças Holandês preto e branco, Jersey, Gir
1185 e mestiços com sinais clínicos compatíveis de infecções umbilicais, provenientes de 27
1186 fazendas leiteiras do estados de São Paulo, Minais Gerais, Goiás e Paraná, Brasil. As
1187 amostras foram coletadas entre 2020 e 2021 de todos os bezerros que apresentavam
1188 sinais clínicos de infecção umbilical. Bezerros amostrados apresentavam média de 9,4
1189 dias de idade (entre 1 e 30 de idade), dos quais 42% (63/150) eram machos e 58%
1190 (87/150) fêmeas. Os animais eram provenientes de fazendas com clima tropical, de
1191 tamanho médio (entre 20 e 200 hectares), com diferentes tamanhos de rebanho. Os
1192 animais eram criados a pasto, em condições similares de nutrição, manejo, tecnificação
1193 das fazendas e condições sanitárias, incluindo de vacinas compulsórias. Informações
1194 sobre complicações clínicas e mortalidade dos bezerros amostrados foram obtidas após
1195 seis meses do nascimento.

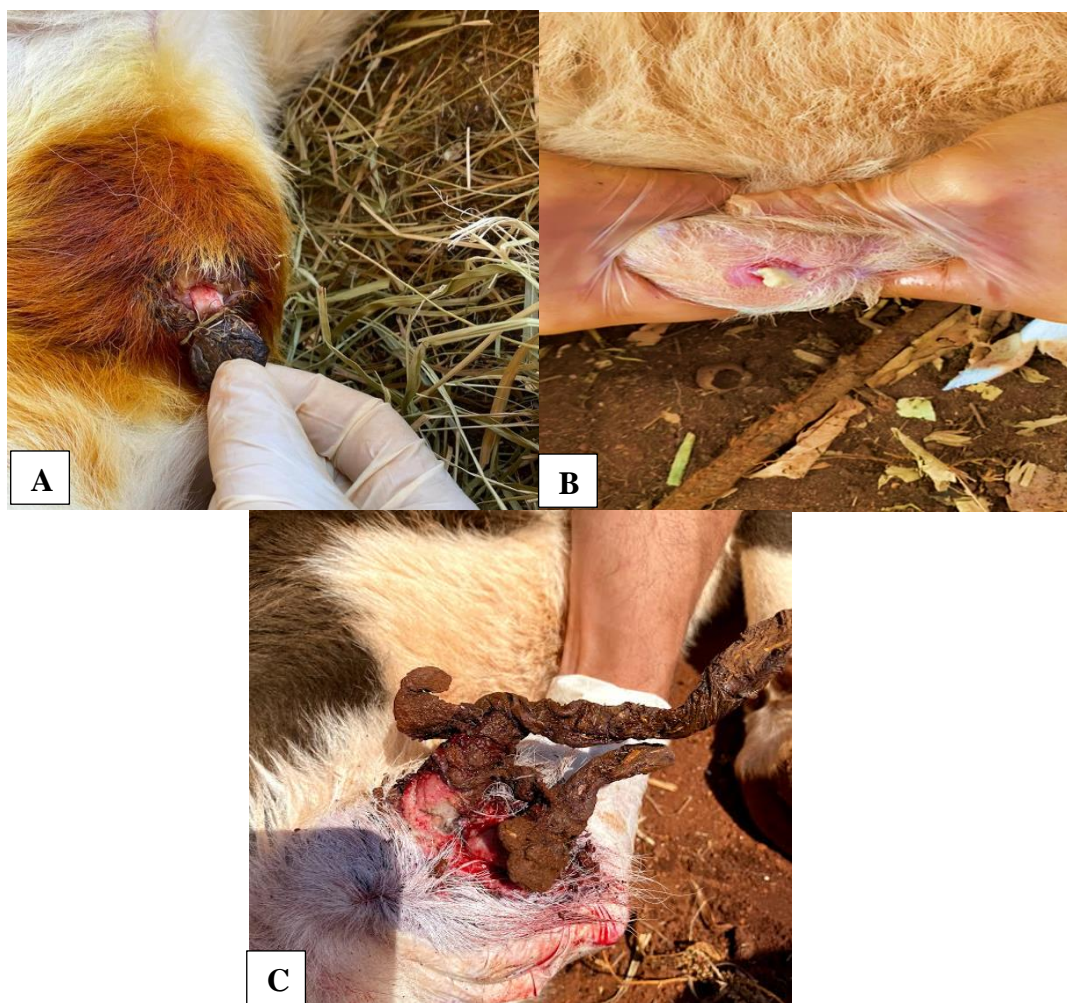
1196 Os escores de gravidade clínica das infecções umbilicais dos bezerros foram
1197 avaliados conforme proposto por Rodrigues et al. (2010), Steerforth; Winden (2018) e
1198 Hintz et al. (2019), com modificações, como segue: **Grau 0 (normal)**: estruturas
1199 umbilicais em processo de involução, sem dor, aumento de volume ou outros sinais
1200 inflamatórios. Bezerro aparentemente sadio; **Grau 1 (infecção umbilical leve)**: dor à
1201 palpação e aumento da temperatura local, endurecimento e/ou aumento da espessura
1202 do coto umbilical (≥ 1 cm). Bezerro sem outros sinais clínicos; **Grau 2 (infecção**
1203 **umbilical moderada)**: sinais de grau 1 supracitados, presença de pus e aumento da
1204 espessura umbilical; **Grau 3 (infecção umbilical grave)**: sinais de grau 2 supracitados
1205 aliados ao aumento da temperatura retal (40°C), presença de hérnia e sinais sistêmicos
1206 (febre, anorexia, apatia, taquicardia e taquipneia).

1207

1208 **Colheita e processamento das amostras**

1209 Foram coletadas amostras somente de animais com escore de gravidade 1, 2 e
1210 3 (Figura 1). A colheita da secreção umbilical foi realizada utilizando suabe estéril com
1211 o animal em decúbito lateral, contido manualmente, após antisepsia prévia da pele e
1212 porção externa ao umbigo com gaze embebida em solução de álcool (70%) e iodo (2%).
1213 A haste do suabe foi introduzida totalmente no umbigo e imediatamente acondicionada
1214 em meio líquido de transporte (Stuart, Absorve[®], Hangzhou, CHN), em condições de
1215 refrigeração (4-8°C). Todas as amostras foram transportadas para os laboratórios de
1216 Microbiologia e de Pesquisa em Bacteriologia da FMVZ–UNESP/Botucatu, SP, para a
1217 realização das técnicas microbiológicas.

1218



1219 **Figura 1.** Escores de gravidade clínica de infecções umbilicais em bezerros: A) escore 1
 1220 (infecção leve), B) escore 2 (infecção moderada) e C) escore 3 (infecção moderada). Brasil,
 1221 2019-2020.

1222

1223 **Cultivo bacteriológico**

1224 Todas as 150 amostras de secreção umbilical dos bezerros foram cultivadas em
 1225 ágar suplementado com sangue bovino (5%) desfibrinado e ágar MacConkey, mantidas
 1226 em condições de aerobiose, a 37°C, por 72 horas (Quinn et al., 2011). Simultaneamente,
 1227 as amostras foram cultivadas em ágar suplementado com sangue bovino (5%)
 1228 desfibrinado e caldo cérebro coração (BHI), e as placas incubadas em condições de
 1229 anaerobiose, a 37°C, mantidas por 96 horas. Os micro-organismos foram
 1230 preliminarmente identificados com base em métodos fenotípicos (aspecto das colônias,
 1231 coloração de Gram, testes bioquímicos (Quinn et al., 2011) e posteriormente
 1232 encaminhados para o diagnóstico em nível de espécies dos agentes por espectrometria
 1233 de massas.

1234

1235 **Cultivo fúngico**

1236 Simultaneamente ao cultivo bacteriológico, os suabes umbilicais dos 150
1237 bezerros foram semeados em tubos contendo ágar Sabouraud-dextrose, suplementado
1238 com 0,5% de cloranfenicol. Os tubos foram incubados a 37°C e examinados a cada 3
1239 dias, por até 25 dias. Colônias com aspecto fúngico ou leveduriforme foram
1240 preliminarmente classificadas com base em aspectos fenotípicos (aparência das
1241 colônias e coloração de lactofenol de azul de algodão) (Lacaz et al., 2002). Micro-
1242 organismos de aspecto leveduriforme foram encaminhados para diagnóstico de espécie
1243 para a espectrometria de massas.

1244

1245 **Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry –** 1246 **MALDI-TOF MS**

1247 Todos os isolados de origem bacteriana e leveduriformes foram submetidos à
1248 técnica de espectrometria de massas (MALDI-TOF) no laboratório de Pesquisa de
1249 Qualidade do Leite (QUALILEITE), do Departamento de Nutrição e Produção Animal da
1250 FMVZ - USP/Pirassununga, SP.

1251 Para tanto, três a quatro colônias recém isoladas (24 a 48h) em ágar sangue
1252 foram submetidas à extração com 20-40µL de ácido fórmico (70%) e centrifugadas,
1253 visando a lise bacteriana e liberação de proteínas (predominantemente de origem
1254 ribossomal) e formação de íons, necessários para a formação dos espectros
1255 bacterianos. Cerca de 15 minutos depois, foi adicionado em cada amostra 20-40µL de
1256 acetromil (100% P.A.) na mesma proporção do ácido fórmico (1:1) e o material
1257 centrifugado. Em seguida, 1µL da solução de cada amostra foi adicionada em placas
1258 específicas contendo 96 orifícios (Bruker e Daltonics™, Bremen, Alemanha) e mantidas
1259 por cerca de 20 minutos para secar em temperatura ambiente. Em seguida, os orifícios
1260 com as amostras secas foram cobertos com 1µL de solução matriz (ácido 2-ciano-4-
1261 hidroxicinâmico diluído a 50% de acetromil e 2,5% de ácido trifluoracético). As placas
1262 foram dispostas no receptáculo do equipamento MALDI-TOF MS (Bruker e Daltonics™,
1263 Bremen, Alemanha), operado com 337-nm de laser. Os dados dos espectros foram
1264 analisados entre 2.000-20.000m/z, usando o software FlexControl 3.3. A caracterização
1265 em nível de gênero e espécie dos isolados foi considerada somente para os espectros
1266 ≥ 2.0 (Barreiro et al., 2010; Gonçalves et al., 2014).

1267

1268 **Teste de sensibilidade microbiana *in vitro* dos isolados**

1269 Todos os isolados bacterianos foram submetidos ao teste padrão de difusão com
1270 discos conforme Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (CLSI, 2020a,
1271 2020b) utilizando nove antimicrobianos pertencentes a sete classes de fármacos,

1272 preferencialmente utilizados no tratamento de infecções bacterianas em bezerros, a
1273 saber: 1) aminoglicosídeos (gentamicina 10 mcg), 2) anfenicóis (florfenicol 30 mcg), 3)
1274 cefalosporinas (ceftiofur 30 mcg); 4) fluorquinolonas (enrofloxacino 5 mcg e
1275 marbofloxacino 5mcg), 5) penicilinas semissintéticas e naturais (ampicilina 10 mcg,
1276 amoxicilina + ácido clavulânico 30 mcg), 6) sulfonamidas (sulfametoxazol/trimetoprim -
1277 25 mcg) e 7) tetraciclinas (oxitetraciclina 30 mcg).

1278

1279 **Cálculo da amostragem**

1280 O cálculo do tamanho amostral foi realizado para estimar a prevalência
1281 associada a uma margem de erro. Adotando prevalência estimada de 20% de infecções
1282 umbilicais com margem de erro de $\pm 5\%$, seria necessário amostrar, no mínimo, 139
1283 bezerros. O cálculo supracitado foi realizado utilizando o programa Open Epi
1284 (https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm) (DEAN et al., 1994).

1285 Os resultados foram apresentados sob a forma descritiva em valores percentuais
1286 de isolados bacterianos, escores de gravidade e multirresistência bacteriana.

1287

1288 **RESULTADOS**

1289

1290 **Dados dos bezerros amostrados**

1291 Do total de 27 fazendas, 63% (17/27) realizavam antissepsia umbilical dos
1292 bezerros ao nascimento, enquanto 37% (10/27%) não realizavam procedimento de
1293 higiene e/ou antissepsia umbilical após o nascimento.

1294 Do total de bezerros amostrados, 42% (63/150) eram machos e 58% (87/150)
1295 fêmeas, com idade média de 9,4 dias (1 a 30 dias). Destes, 70,7% (106/150)
1296 apresentavam idade entre 1 e 10 dias, 18% (27/150) entre 11 e 20 dias e 11,3% (17/150)
1297 entre 21 e 30 dias.

1298 Do total de amostras, foi confirmado o isolamento microbiano em 142 animais
1299 (94,7%), enquanto em oito (5,3%) animais não foi obtido o isolamento microbiano.

1300 Do total de bezerros, 66% (99/150) apresentavam exclusivamente infecção
1301 umbilical. No entanto, 34% (51/150) também foram observados outros sinais clínicos,
1302 incluindo diarreia (20/51=39,2%), diarreia + artrite (5/51=9,8%), pneumonia
1303 (4/51=7,8%), pneumonia + miíase umbilical (3/51=5,9%), pneumonia + diarreia
1304 (3/51=5,9%) e febre + linfadenite (3/51=5,9%). Uma miscelânea de outros sinais foi
1305 observada em menor frequência (13/51=25,5%), como hérnia + laceração do coto
1306 umbilical; conjuntivite + miíase; infestação por ectoparasitas; anaplasnose/babesiose e
1307 sinais neurológicos.

1308 A padronização dos escores de gravidade clínica dos casos de infecções
1309 umbilicais de bezerros tem sido objeto de estudos (Steerforth e Winden, 2018; Hints et
1310 al., 2019). Entre os 150 animais do presente estudo, número equivalente (de
1311 aproximadamente 50 bezerros) foram amostrados com escores 1 (leve), 2 (moderada)
1312 ou 3 (grave) de severidade clínica das infecções umbilicais. Nestes, foi observado
1313 número equivalente de isolados de *E. coli* nos casos três escores de gravidade clínica
1314 das infecções umbilicais.

1315 Foi possível obter informações de complicações dos casos das onfalopatias de
1316 somente de 14% (21/150) dos animais amostrados. Esses animais foram
1317 acompanhados até a desmama que ocorreu, em média, aos 45 dias de idade. Destes,
1318 42,8% (9/21) eram machos descartados, 28,6% (6/21) evoluíram para óbito, 19,1%
1319 (4/21) desenvolveram poliartrite e 9,5% (2/21) emagrecimento progressivo.

1320

1321 **Identificação microbiológica**

1322 A frequência dos micro-organismos isolados, em cultura pura ou em coinfeções,
1323 diagnosticados pela técnica de MALDI-TOF, encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

1324 Foram obtidos 231 isolados, dos quais 82,3% (190/231) de origem bacteriana e
1325 17,7% (41/231) fungos e leveduras. Em 50,7% (72/142) das amostras houve o
1326 isolamento em cultura pura de bactérias e fungos, enquanto em 49,3% (70/142) ocorreu
1327 o isolamento com associações entre os micro-organismos.

1328 Os principais micro-organismos isolados em cultura pura foram: *E. coli*
1329 (27/72=37,5%), *Staphylococcus sciuri* (4/72=5,5%), *Enterobacter xiangfangensis*
1330 (3/72=4,2%) e em 52,8% (38/72) várias outras espécies de micro-organismos (Tabela
1331 1).

1332 Os principais micro-organismos identificados em associação foram: *Aerococcus*
1333 *viridans* + *Candida catenulata* (2/70=2,9%) *Escherichia coli* + *Aspergillus fumigatus*
1334 (2/70=2,9%), *Escherichia coli* + *Aspergillus terreus* (2/70=2,9%), *E. coli* + *Proteus*
1335 *vulgaris* (2/70=2,9%), *Helcococcus ovis* + *Aspergillus niger* (2/70=2,9%) e em 85,7%
1336 (60/70) outras associações (Tabela 2).

1337

1338 **TABELA 1.** Frequência de micro-organismos de origem bacteriana e fúngica isolados
 1339 em cultura pura, obtidos de casos de infecções umbilicais em 150 bezerros neonatos.
 1340 Brasil, 2020-2021.

1341

Micro-organismos	N	%
<i>Escherichia coli</i>	27	37,5
<i>Staphylococcus sciuri</i>	4	5,5
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	3	4,2
<i>Acinetobacter schindleri</i>	2	2,8
<i>Escherichia hermannii</i>	2	2,8
<i>Morganella morganii</i>	2	2,8
<i>Pseudomonas fulva</i>	2	2,8
<i>Pseudomonas koereensis</i>	2	2,8
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	2,8
<i>Escherichia vulneris</i>	1	1,4
*Outros	25	34,7
Total Geral	72	100

1342 **Acinetobacter* sp. (1=1,4%), *Aerococcus viridans* (1=1,4%), *Aeromonas jandaei* (1=1,4%), *Aspergillus*
 1343 *terreus* (1=1,4%); *Candida parapsilosis* (1=1,4%); *Citrobacter freundii* (1=1,4%), *Desemzia incerta*
 1344 (1=1,4%), *Enterobacter cloacae* (1=1,4%), *Enterococcus casseliflavus* (1=1,4%), *Klebsiella oxytoca*
 1345 (1=1,4%), *Kocuria marina* (1=1,4%), *Proteus hauseri* (1=1,4%), *Proteus mirabilis* (1=1,4%), *Providencia*
 1346 *rettgeri* (1=1,4%), *Pseudomonas mendocina* (1=1,4%), *Psycrobacter sanguinis* (1=1,4%), *Psycrobacter* sp.
 1347 (1=1,4%), *Serratia marcescens* (1=1,4%), *Staphylococcus xylosus* (1=1,4%), *Staphylococcus arlettae*
 1348 (1=1,4%), *Staphylococcus epidermidis* (1=1,4%), *Staphylococcus equorum* (1=1,4%), *Staphylococcus*
 1349 *pseudintermedius* (1=1,4%), *Staphylococcus simulans* (1=1,4%) e *Streptococcus suis* (1=1,4%).
 1350
 1351

1352 **TABELA 2.** Frequência de micro-organismos de origem bacteriana ou fúngica isolados
 1353 em associação, em infecções umbilicais em 150 bezerros neonatos. Brasil, 2020-2021.

Micro-organismos	N	%
<i>Aerococcus viridans</i> + <i>Candida catenulata</i>	2	2,9
<i>Escherichia coli</i> + <i>Aspergillus fumigatus</i> .	2	2,9
<i>Escherichia coli</i> + <i>Aspergillus terreus</i>	2	2,9
<i>Escherichia coli</i> + <i>Proteus vulgaris</i>	2	2,9
<i>Helcococcus ovis</i> + <i>Aspergillus niger</i>	2	2,9
<i>Aerococcus viridans</i> + <i>Aspergillus fumigatus</i>	1	1,4
<i>Aeromonas hydrophila</i> + <i>Psycrobacter sanguinis</i>	1	1,4
<i>Arthrobacter gandavensis</i> + <i>Candida catenulata</i>	1	1,4
<i>Corynebacterium amycolatum</i> + <i>Brevibacterium luteolum</i>	1	1,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Citrobacter youngae</i>	1	1,4
<i>Proteus mirabilis</i> + <i>Streptococcus canis</i>	1	1,4
<i>Staphylococcus chromogenes</i> + <i>Candida catenulata</i>	1	1,4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Streptococcus oralis</i>	1	1,4
<i>Trueperella pyogenes</i> + <i>Helcococcus ovis</i>	1	1,4
<i>Acinetobacter johnsonii</i> + <i>Streptococcus uberis</i> + <i>Aspergillus niger</i>	1	1,4
<i>Escherichia coli</i> + <i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Proteus vulgaris</i>	1	1,4
<i>Enterobacter xiangfangensis</i> + <i>Pseudomonas mendocina</i> + <i>Aspergillus terreus</i>	1	1,4
<i>Pseudomonas putida</i> + <i>Staphylococcus xylosos</i> + <i>Aspergillus niger</i>	1	1,4
*Outros	47	67,2
Total Geral	70	100

**Aeromonas hydrophila* + *Serratia liquefaciens* (1=1,4%); *Arthrobacter gandavensis* + *Aspergillus fumigatus* (1=1,4%); *Aspergillus fumigatus* + *Serratia marcescens* (1=1,4%); *Citrobacter sedlakii* + *Proteus penneri* (1=1,4%); *Enterobacter cloacae* + *Aspergillus terreus* (1=1,4%); *Enterobacter xiangfangensis* + *Aspergillus fumigatus* (1=1,4%); *Enterobacter xiangfangensis* + *Aspergillus niger* (1=1,4%); *Enterococcus faecalis* + *Arthrobacter polychromogenes* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Aerococcus viridans* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Aeromonas hydrophila* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Aspergillus niger*; (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Comamonas divergens* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Comamonas jangadensis* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Enterobacter cancerogenus* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Enterobacter cloacae* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Enterococcus faecalis* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Enterococcus faecium* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Escherichia hermannii* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Lactococcus garvieae* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Morganella morganii* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Proteus hauseri* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Providencia rettgeri* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Raoultella ornithinolytica* (1=1,4%); *Leuconostoc lactis* + *Siccibacter turicensis* (1=1,4%); *Pantoea agglomerans* + *Aspergillus niger* (1=1,4%); *Proteus hauseri* + *Enterobacter kobei* (1=1,4%); *Proteus mirabilis* + *Aspergillus terreus* (1=1,4%); *Proteus penneri* + *Aspergillus terreus* (1=1,4%); *Pseudomonas mendocina* + *Aspergillus fumigatus* (1=1,4%); *Pseudomonas protegens* + *Aspergillus fumigatus* (1=1,4%); *Pseudomonas stutzeri* + *Aspergillus niger* (1=1,4%); *Staphylococcus chromogenes* + *Aspergillus fumigatus* (1=1,4%); *Staphylococcus chromogenes* + *Helcococcus ovis* (1=1,4%); *Staphylococcus lentus* + *Fusarium spp* (1=1,4%); *Staphylococcus xylosos* + *Psycrobacter sanguinis* (1=1,4%); *Aerococcus viridans* + *Bacillus licheniformes* + *Aspergillus terreus* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Aeromonas hydrophila* + *Proteus vulgaris* + *Aspergillus fumigatus* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Klebsiella pneumoniae* + *Vagococcus lutrae* + *Aspergillus niger* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Pseudomonas montelli* + *Aspergillus fumigatus* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Enterococcus faecalis* + *Aspergillus fumigatus* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Enterococcus hirae* + *Streptococcus equinus* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Streptococcus dysgalactie* + *Aspergillus niger* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Streptococcus uberis* + *Fusarium spp.* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Trueperella pyogenes* + *Aspergillus fumigatus* (1=1,4%); *Escherichia coli* + *Vagococcus fluvialis* + *Proteus vulgaris* (1=1,4%); *Pantoea dispersa* + *Fusarium spp* + *Staphylococcus xylosos* (1=1,4%).

1376 Enterobactérias

1377 Foram isoladas enterobactérias em 55,3% (105/190) das amostras em cultura
 1378 pura ou em associação. *E. coli* (59/105=56,2%) foi a espécie bacteriana prevalente nos
 1379 animais amostrados, seguida em menor frequência por outras enterobactérias como
 1380 *Proteus spp.* (13/105=12,4%), *Enterobacter spp.* (11/105=10,5%), *Citrobacter spp.*
 1381 (3/105=2,9%), *Escherichia hermani* (3/105=2,9%), *Klebsiella spp.* (3/105=2,9%),
 1382 *Morganella morganii* (3/105=2,9%), *Serratia spp.* (3/105=2,9%), *Pantoea spp.*
 1383 (2/105=1,9%), *Providencia rettgeri* (2/105=1,9%), *Escherichia vulneris* (1/105=0,9%),

1384 *Raoutella ornithinolytica* (1/105=0,9%) e *Siccibacter turicensis* (1/105=0,9%) (Tabelas 1
1385 e 2).

1386

1387 ***Staphylococcus* spp.**

1388 Colônias típicas de estafilococos foram isoladas em 10% (19/190) das amostras,
1389 em cultura pura ou em associação, com predomínio de *S. sciuri* (4/19=21%), *S. xylosus*
1390 (4/19=21%), *S. chromogenes* (3/19=15,8%), *S. epidermidis* (2/19=10,5%), seguido em
1391 menor frequência por *S. arlettai* (1/19=5,3%), *S. aureus* (1/19=5,3%), *S. equorum*
1392 (1/19=5,3%), *S. lentus* (1/19=5,3%), *S. pseudintermedius* (1/19=5,3%) e *S. simulans*
1393 (1/19=5,3%) (Tabelas 1 e 2).

1394

1395 ***Pseudomonas* spp.**

1396 Foram isoladas colônias compatíveis com o gênero *Pseudomonas* em 6,8%
1397 (13/190) das amostras, em cultura pura ou em associação. *P. mendocina* foi a espécie
1398 mais frequente (3/13=23,1%), seguida de *P. fulva* (2/13=15,4%), *P. koereensis*
1399 (2/13=15,4%), *P. protegens* (2/13=15,4%), *P. aeruginosa* (1/13=7,7%), *P. monteilli*
1400 (1/13=7,7%), *P. putida* (1/13=7,7%) e *P. stutzeri* (1/13=7,7%) (Tabelas 1 e 2).

1401

1402 **Enterococcaceae (*Enterococcus* sp e *Vagococcus* sp)**

1403 Colônias compatíveis com o gênero *Enterococcus* foram isoladas em 4,2%
1404 (8/190) das amostras, em cultura pura ou em associação, das quais foram identificadas
1405 espécies de *Enterococcus* e *Vagococcus*, pertencentes a família Enterococcaceae –
1406 como segue: *Enterococcus faecalis* (3/8=37,5%), *Enterococcus casseliflavus* (1/8=12,5%),
1407 *Enterococcus faecium* (1/8=12,5%), *Enterococcus hirae* (1/8=12,5%), *Vagococcus fluvialis*
1408 (1/8=12,5%) e *Vagococcus lutrae* (1/8=12,5%) (Tabelas 1 e 2).

1409

1410 **Actinomicetos**

1411 Foram isoladas colônias compatíveis com actinomicetos em 3,7% (7/190) das
1412 amostras, em cultura pura ou em associação, com identificação de *Arthrobacter*
1413 *gandavensis* (2/7=28,6%), *Trueperella pyogenes* (2/7=28,6%), *Arthrobacter*
1414 *polychromogenes* (1/7=14,3%), *Brevibacterium luteolum* (1/7=14,3%) e *Corynebacterium*
1415 *amycolatum* (1/7=14,3%) (Tabelas 1 e 2).

1416

1417 ***Streptococcus* spp.**

1418 Colônias típicas de estreptococos foram isoladas em 3,7% (7/190) das amostras,
1419 em cultura pura ou em associação, com predomínio de *S. uberis* (2/7 = 28,6%), seguido

1420 por *S. canis* (1/7=14,3%), *S. dysgalactiae* (1/7=14,3%), *S. equinus* (1/7=14,3%), *S. oralis*
1421 (1/7=14,3%) e *S. suis* (1/7=14,3%) (Tabelas 1 e 2).

1422

1423 **Fungos**

1424 Micro-organismos de origem fúngica e leveduras foram isolados em 27,3%
1425 (41/150) das amostras, em cultura pura ou em associação (Tabelas 1 e 2). O gênero
1426 mais frequente foi *Aspergillus fumigatus* (15/41=36,6%), seguido por *Aspergillus niger*
1427 (10/41=24,4%), *Aspergillus terreus* (8/41=19,5%), *Candida catenulata* (4/41=9,8%),
1428 *Fusarium* spp. (3/41=7,3%) e *Candida parapsilosis* (1/41=2,4%).

1429

1430 **Anaeróbios**

1431 Os cultivos microbiológicos em anaerobiose não revelaram colônias compatíveis
1432 com clostrídios ou anaeróbios estritos.

1433

1434 **Outros micro-organismos**

1435 Diferentes espécies dos gêneros *Aerococcus*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*,
1436 *Helcococcus*, *Psicrobacter* e *Bacillus* foram isoladas em baixa frequência (Tabelas 1 e
1437 2).

1438

1439 **Escores de gravidade das infecções umbilicais e micro-organismos**

1440 Com base na gravidade dos sinais de infecção umbilical, foram observados os
1441 seguintes escores nos bezerros: 34% (51/150) grau 1 (leve), 34% (51/150) grau 2
1442 (moderada) e 32% (48/150) grau 3 (grave).

1443 Dentre os 51 animais que apresentaram escore de gravidade 1, foram isolados
1444 62 micro-organismos, nos quais os gêneros/espécies mais frequentes foram *E. coli*
1445 (19/62=30,6%), *Proteus* spp. (5/62=8,1%), *Pseudomonas* spp. (5/62=8,1%),
1446 *Staphylococcus* spp. (5/62=8,1%), *Enterobacter* spp. (4/62=6,4%) e *Streptococcus* spp.
1447 (4/62=6,4%). Entre os bezerros com escore 2 de gravidade, foram isolados 61 micro-
1448 organismos, com predomínio de *Escherichia coli* (14/61=22,9%), *Staphylococcus* spp.
1449 (7/61=11,5%), *Enterobacter* spp. (5/61=8,2%), *Aerococcus viridans* (4/61=5,5%),
1450 *Pseudomonas* spp. (3/61=4,9%) e *Enterococcus* spp. (3/61=4,9%). Nos animais com
1451 escore gravidade 3, foram isolados 71 micro-organismos, com maior frequência de
1452 *Escherichia coli* (26/71=36,6%), *Staphylococcus* spp. (7/71=9,8%), *Proteus* spp.
1453 (6/71=8,4%), *Pseudomonas* spp. (5/71=7,04%), *Aeromonas hydrophila* (3/71=4,2%),
1454 *Enterobacter xiangfangensis* (2/71=2,8%) e *Helcococcus ovis* (2/71=2,8%).

1455

1456

1457 **Teste de sensibilidade microbiana *in vitro***

1458 Sensibilidade moderada (entre 50-70%) dos isolados foi observada para o
1459 marbofloxacino (128/190=67,4%), amoxicilina/ácido clavulânico (121/190=63,7%),
1460 gentamicina (112/190=58,9%) e florfenicol (106/190=55,8%). Em contraste, os isolados
1461 apresentaram maior resistência para sulfametoxazol/trimetoprim (159/190=83,7%),
1462 ampicilina (114/190=60%) e tetraciclina (101/151=53,1%) (Tabela 3).

1463 A resistência simultânea a ≥ 3 dos diferentes grupos de antimicrobianos
1464 (multirresistência) foi observada em 83,7% (n=159/190) dos isolados.

1465

1466 **TABELA 3.** Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* em 190 isolados bacterianos
1467 obtidos de infecções umbilicais em 150 bezerros neonatos. Brasil, 2020-2021.

1468

Classes	Antimicrobianos	Sensibilidade		
		S (%)	PS (%)	R (%)
Aminoglicosídeos	Gentamicina	112 (58,9)	35 (18,4)	43 (22,7)
Anfenicóis	Florfenicol	106 (55,8)	17 (8,9)	67 (35,3)
Cefalosporinas	Ceftiofur	75 (39,5)	55 (28,9)	60 (31,6)
Fluorquinolonas	Enrofloxacino	78 (41)	53 (27,9)	59 (31,1)
	Marbofloxacino	128 (67,4)	22 (11,6)	40 (21)
Penicilinas	Ampicilina	57 (30)	19 (10)	114 (60)
	Amoxicilina + clavulanato	121 (63,7)	19 (10)	50 (26,3)
Sulfonamidas	Sulfametoxazol/trimetoprim	23 (12,1)	8 (4,2)	159 (83,7)
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	63 (33,2)	26 (13,7)	101 (53,1)

1469 S=sensível, PS=parcialmente sensível, R=resistente

1470

1471 **DISCUSSÃO**

1472 Grande complexidade de micro-organismos de origem bacteriana foi observada
1473 em 150 bezerros com infecções umbilicais, com predomínio de enterobactérias –
1474 particularmente *E. coli* – reforçando o impacto deste grupo de bactérias na gênese dos
1475 casos, e a necessidade de adoção de ações de profilaxia/controlado para infecções
1476 umbilicais em bezerros neonatos. Ainda, foi observada elevada multirresistência *in vitro*
1477 (>80%) dos isolados aos antimicrobianos, reforçando a preocupação emergente, de
1478 âmbito mundial, de uso racional de antimicrobianos.

1479 As enterobactérias foram os micro-organismos isolados em maior frequência das
1480 amostras, em cultura pura ou em associação, com predomínio de *E. coli* (56,2%),
1481 seguido de espécies dos gêneros estafilococos (10%), *Pseudomonas* (6,8%),

1482 enterococos (4,2%), actinomicetos (3,7%) e estreptococos (3,7%), além de fungos e
1483 leveduras (27,3%). O predomínio de enterobactérias e outros patógenos gram-
1484 negativos nas infecções umbilicais de bezerros concorda com estudos similares
1485 conduzidos na Colômbia (Cardona et al., 2011), Iran (Faradonbeh e Faradonbeh, 2016)
1486 e Brasil (Rengifo et al. 2006) e pode ser creditado a elevada exposição do umbigo, nos
1487 primeiros dias pós-parto, a patógenos que possuem como habitat o ambiente dos
1488 animais, particularmente as enterobactérias (Steerforth e Windem, 2018).

1489 As enterobactérias, particularmente *E. coli*, são classicamente subdivididas em
1490 entéricas e extraentéricas (ExPEC), e se caracterizam pela grande complexidade de
1491 fatores de virulência, incluindo produção de toxinas, fímbrias/adensinas, fatores de
1492 captação de ferro, invasinas e resistência ao soro (Sarowska et al., 2019). No entanto,
1493 não está esclarecido o perfil genotípico de *E. coli* no estabelecimento das infecções
1494 umbilicais em bezerros, tampouco a influência destes genes - hipoteticamente com
1495 predomínio de ExPEC - nos escores de gravidade clínica das infecções umbilicais em
1496 bezerros.

1497 Outras enterobactérias identificadas nos animais amostrados foram
1498 representadas por espécies do gênero *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*,
1499 *Morganella*, *Serratia*, *Providencia*, *Pantoea*, além de *Raoultella ornithinolytica*,
1500 *Siccibacter turicensis*, *Escherichia hermani* e *Escherichia vulneris*. Tal achado reforça a
1501 complexidade etiológica e o impacto das enterobactérias como agentes primários de
1502 infecções umbilicais em bezerros adquiridas, provavelmente, pela contaminação da
1503 região umbilical a partir de fezes, matéria orgânica, solo, terra, água ou utensílios
1504 contaminados do próprio ambiente dos animais (Faradonbeh e Faradonbeh, 2016).

1505 Espécies do gênero *Proteus* são enterobactérias de reconhecido comportamento
1506 oportunista, associadas principalmente com infecções umbilicais, enterite e afecções
1507 em cascos de ruminantes (Quinn et al., 2011), bem como infecções do conduto auditivo,
1508 trato geniturinário e digestório em animais de companhia (Zappa et al., 2017),
1509 geralmente relacionadas com contaminação hídrica. Neste contexto, estudo na
1510 Colômbia investigou a etiologia de agentes causais de infecções umbilicais em bezerros
1511 e revelou predomínio de *P. vulgaris*, em detrimento de *P. mirabilis* (Cardona et al., 2011).
1512 Em contraste, estudo no Brasil também investigou a etiologia das infecções umbilicais
1513 em bezerros e não identificou espécies de *Proteus* (Rengifo et al., 2006). No presente
1514 estudo, ambas espécies de *Proteus* foram identificadas em pequeno número de
1515 animais. Tal variação no isolamento dos patógenos nas infecções umbilicais pode
1516 encontrar justificativa no manejo, nas condições ambientais e higiênicas que os bezerros
1517 recém-nascidos são mantidos, que podem influenciar na exposição da região umbilical
1518 aos patógenos no ambiente dos criatórios (Salci et al., 2017; Steerforth e Windem, 2018).

1519 De modo similar ao gênero *Proteus*, *Pseudomonas* sp. se caracteriza por grande
1520 variedade de infecções clínicas em animais e humanos, particularmente adquiridas em
1521 pacientes hospitalizados, comumente refratárias aos antimicrobianos convencionais
1522 (Drzewiecka, 2016; Pachori et al., 2019). O micro-organismo está amplamente
1523 distribuído no ambiente dos criatórios de animais, fato que favorece infecções de
1524 natureza oportunista, principalmente relacionadas a contaminações a partir de ambiente
1525 hídrico (Schauer et al., 2021), incluindo infecções umbilicais em bezerros (Cardona et
1526 al., 2011; Faradonbeh e Faradonbeh, 2016). *P. mendocina*, *P. fulva*, *P. koereensis*, *P.*
1527 *protegens*, *P. aeruginosa*, *P. monteilli* e *P. stutzeri* foram as espécies do gênero
1528 *Pseudomonas* identificadas no presente estudo. A grande variedade de espécies de
1529 *Pseudomonas* identificada como agentes primários de infecções umbilicais nos animais
1530 amostrados indica provável excesso de umidade e dejetos no ambiente dos bezerros,
1531 que favorecem infecções por este patógeno (Schauer et al., 2021). No presente estudo,
1532 grande parte dos animais que tiveram identificação de *Pseudomonas* spp.,
1533 encontravam-se em ambientes com acúmulo de sujidades, matéria orgânica e água. O
1534 que pode ter contribuído para a infecção umbilical por estes agentes.

1535 Os estafilococos se caracterizam como grupo complexo de cocos gram-
1536 positivos, que possuem como habitat a pele, mucosas e conjuntivas dos animais e
1537 humanos, relacionados a várias manifestações clínicas (Mcculloch e Mamizuca, 2015).
1538 Estudos no Brasil descreveram os estafilococos como patógenos primários de casos de
1539 infecções umbilicais em bezerros (Rengifo et al., 2006), incluindo por *S. aureus*
1540 (Cardona et al., 2011). No presente estudo, espécies do gênero *Staphylococcus* foram
1541 identificadas em 10% dos bezerros amostrados, com predomínio de *S. sciuri*, *S. xylosus*,
1542 *S. chromogenes*, *S. epidermidis* e *S. aureus*. À semelhança das enterobactérias e outros
1543 agentes gram-negativos identificados nos animais amostrados, a variação na ocorrência
1544 de patógenos em estudos de infecção umbilical em bezerros pode encontrar justificativa
1545 em diferenças de manejo, nas condições ambientais, higiênicas e de alojamento dos
1546 animais recém-nascidos, que podem influenciar na exposição da região umbilical aos
1547 patógenos (Faradonbeh e Faradonbeh, 2016).

1548 De modo similar aos estafilococos, os estreptococos são grupo complexo de
1549 cocos gram-positivos encontrados na pele, conjuntiva e mucosas dos animais e
1550 humanos, embora algumas espécies sejam adaptadas ao ambiente. Este grupo de
1551 micro-organismos causa diferentes manifestações clínicas, caracterizadas por
1552 processos piogênicos (Quinn et al., 2011), incluindo infecções umbilicais em bezerros
1553 (Cardona et al., 2011). *S. uberis*, *S. canis*, *S. dysgalactiae*, *S. equinus*, *S. oralis* e *S. suis*
1554 foram as espécies de estafilococos detectadas nos bezerros amostrados com infecção
1555 umbilical. Curiosamente, certas espécies identificadas no presente estudo são agentes

1556 conhecidos de mastite em vacas, transmitidos principalmente a partir da pele do úbere,
1557 equipamentos e utensílios de ordenha, caracterizados como agentes contagiosos
1558 (Ruegg, 2017), reforçando a importância da antissepsia do umbigo de animais neonatos
1559 no controle deste grupo de patógenos.

1560 Espécies da família Enterococcaceae foram outro grupo de cocos gram-positivos
1561 identificados no presente estudo, com predomínio de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus*
1562 *casseliflavus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Vagococcus fluvialis* e
1563 *Vagococcus lutrae*. Este grupo de bactérias é encontrado na microbiota do sistema
1564 digestório dos animais, causando infecções oportunistas em animais e humanos,
1565 incluindo onfalopatias em bezerros, geralmente associado com falhas na antissepsia do
1566 umbigo nos primeiros dias pós-parto (Rombach et al., 2014).

1567 Os actinomicetos se caracterizam como grupo heterogêneo de bactérias gram-
1568 positivas, encontrados na pele, mucosas e no ambiente, causando infecções
1569 oportunistas em animais e humanos (Constable et al., 2016). No presente estudo, os
1570 actinomicetos foram identificados em baixa frequência (3,7%) nas amostras,
1571 representados por *Arthrobacter gandavensis*, *Trueperella pyogenes*, *Arthrobacter*
1572 *polychromoges*, *Brevibacterium luteolum* e *Corynebacterium amycolatum*. Dentre os
1573 agentes identificados nos bezerros com infecções umbilicais, merece destaque *T.*
1574 *pyogenes*, habitante da pele e mucosas de animais domésticos, comumente refratário
1575 ao tratamento com antimicrobianos convencionais, cuja veiculação aos animais
1576 domésticos tem sido atribuída a presença de moscas no ambiente (Ribeiro et al., 2015).

1577 Fungos e leveduras são micro-organismos amplamente distribuídos no
1578 ambiente, relacionados com infecções oportunistas em humanos e animais,
1579 particularmente em ambientes com excesso de umidade (Elad e Segal., 2018). No
1580 presente estudo, este grupo de agentes foram identificados em 17,7% dos casos de
1581 infecções umbilicais, com predomínio de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e
1582 *Aspergillus terreus* e, em menor frequência, *Candida catenulata*, *Fusarium* spp. e
1583 *Candida parapsilosis*. Neste contexto, *A. fumigatus* e *A. niger* foram isolados em 25
1584 amostras de bezerros com infecções umbilicais com diferentes escores de gravidade
1585 clínica, provavelmente secundários a inadequada antissepsia umbilical dos neonatos,
1586 acúmulo de matéria orgânica e excesso de umidade no ambiente dos bezerros (Elad e
1587 Segal., 2018).

1588 Não foram identificados clostrídios ou outras bactérias anaeróbicas nos 150
1589 bezerros amostrados. Em contraste, bactérias anaeróbicas têm sido citadas como
1590 agentes causais em potencial de infecções umbilicais em bezerros (Constable et al.,
1591 2016). A variação na ocorrência de patógenos em investigações de casos de infecções
1592 umbilicais em bezerros pode ser creditada a diferenças de manejo e condições

1593 ambientais das fazendas, que podem influenciar na exposição umbilical aos patógenos
1594 (Faradonbeh e Faradonbeh, 2016), incluindo de anaeróbios.

1595 Em oito (5,3%) animais não foi obtido o isolamento microbiano nos bezerros
1596 amostrados. Resultado similar foi obtido em estudos envolvendo infecções umbilicais
1597 em bezerros (Rombach et al., 2014) e pode ser creditado a infecção por micro-
1598 organismos que necessitam meios ou condições especiais de isolamento ou
1599 inflamações de origem não microbiana, *i.e.*, traumáticas ou por parasitas.

1600 Sensibilidade moderada (entre 50-70%) dos isolados obtidos dos animais
1601 amostrados foi observada para o marbofloxacino, amoxicilina/ácido clavulânico,
1602 gentamicina e florfenicol, indicando que fármacos dos grupos das fluoroquinolonas,
1603 aminoglicosídeos e a associação amoxicilina/ácido clavulânico podem ser considerados
1604 na abordagem terapêutica de infecções umbilicais em bezerros (Kroemer et al., 2012).
1605 Em contraste, foi observada elevada multirresistência (>80%) *in vitro* dos isolados aos
1606 antimicrobianos, principalmente para sulfametoxazol/trimetoprim, ampicilina e
1607 tetraciclina. A elevada resistência *in vitro* dos isolados para estes fármacos supracitados
1608 era esperada, posto que sulfametoxazol/trimetoprim, ampicilina e tetraciclina são
1609 utilizados há décadas no tratamento de diferentes afecções em ruminantes domésticos
1610 (Giguere et al., 2013).

1611 A emergência da resistência bacteriana aos antimicrobianos em humanos e
1612 animais é considerada problema de saúde única, de âmbito mundial (Blair et al., 2015;
1613 Marston et al., 2016). A resistência bacteriana aos antimicrobianos é codificada por
1614 genes específicos e ocorre por mutações ou aquisição de material genético por
1615 elementos móveis, como plasmídeos, integrons e transposons (Giguère et al., 2013). A
1616 transmissão de patógenos multidroga resistentes para os humanos pode ocorrer pelo
1617 contato direto com animais ou pelo consumo de produtos e subprodutos de origem
1618 animal (Van Boeckel et al., 2015). Com efeito, o uso inadequado de antimicrobianos na
1619 prática terapêutica em animais domésticos pode favorecer o aumento da pressão
1620 seletiva para bactérias resistentes (Giguère et al., 2013), incluindo em infecções
1621 neonatais em bezerros (Schönecker et al., 2020).

1622 Foi possível obter informações de somente 21 bezerros até a desmama, entre
1623 os 150 animais amostrados com infecções umbilicais, fato que pode ser considerado
1624 uma limitação do presente estudo. Não obstante, alta mortalidade (28,6%) foi observada
1625 entre estes animais com informações sobre complicações secundárias às infecções
1626 umbilicais. Este achado é consistente com estudos similares, que referem prejuízos
1627 significativos aos produtores decorrentes das infecções umbilicais, particularmente
1628 devido a mortalidade neonatal (Windeyer et al., 2014, Faradonbeh e Faradonbeh, 2016).
1629 Com efeito, posto os prejuízos causados aos produtores com as infecções umbilicais

1630 em bezerros neonatais, faz-se necessário adotar medidas para a profilaxia da doença
1631 nas fazendas amostradas, incluindo antissepsia umbilical nos primeiros dias pós-parto
1632 e ingestão adequada de colostro nas primeiras horas de vida (Windeyer et al., 2014;
1633 Faradonbeh e Faradonbeh, 2016). Ainda, com base nos achados do presente estudo,
1634 merecem ênfase ações de profilaxia voltadas ao ambiente, e.g., retirada diária de fezes
1635 e matéria orgânica do ambiente dos bezerros, proporcionando ambiente limpo e seco
1636 para os animais; posto a elevada frequência nos animais amostrados de
1637 enterobactérias, outras bactérias gram-negativas, fungos e leveduras, que possuem e
1638 como habitat o ambiente das fazendas.

1639 A maioria dos estudos conduzidos no diagnóstico da etiologia das infecções
1640 umbilicais em bezerros têm sido baseados em métodos clássicos de identificação
1641 fenotípica dos micro-organismos (Rengifo et al. 2006; Cardona et al., 2011; Faradonbeh
1642 e Faradonbeh, 2016). Nos animais amostrados, a identificação dos patógenos em nível
1643 de espécie foi realizada pela técnica molecular de espectrometria de massas, fato que
1644 pode ser considerado uma das principais motivações do presente estudo. O uso da
1645 técnica de MALDI-TOF MS possibilitou a identificação fidedigna em nível de espécie de
1646 isolados de origem bacteriana e leveduriforme, bem como - na literatura consultada -
1647 *Raoultella ornithinolytica*, *Siccibacter turicensis*, *Bacillus licheniformes*, *Carnobacterium*
1648 *divergens*, *Comamonas jangadensis*, *Desemzia incerta*, *Helcococcus ovis*, *Kocuria*
1649 *marina*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus garveae*, *Leuconostoc lactis* e *Vagococcus*
1650 *fluvialis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium* spp., *Candida catenulata*,
1651 e *Candida parapsilosis* foram descritos pela primeira vez como agentes primários de
1652 infecções umbilicais de bezerros com até 30 dias de idade.

1653 Infere-se, portanto, elevada complexidade etiológica das infecções umbilicais em
1654 bezerros com até 30 dias de idade, com predomínio de *E. coli* e outras bactérias de
1655 origem ambiental, requerendo a adoção de ações rigorosas e sistemáticas para a
1656 profilaxia das onfalopatias infecciosas nas fazendas amostradas. Ainda, elevada
1657 multirresistência dos isolados de origem bacteriana foi observada diante de
1658 antimicrobianos convencionais, reforçando a necessidade do uso racional de fármacos
1659 nas abordagens terapêuticas em bovinos.

1660
1661
1662

1661 REFERÊNCIAS

- 1663 Barreiro JR, Ferreira CR, Sanvido GB, Kostrzewa M, Maier T, Wegemann B, Böttcher
1664 V, Eberlin MN, dos Santos MV. 2010. Short communication: Identification of subclinical
1665 cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-
1666 flight mass spectrometry. J Dairy Sci. 93(12):5661-7. doi: 10.3168/jds.2010-3614.
- 1667 Beam, A. L.; Lombard, J. E.; Koprak, C. A.; Garber, L. P.; Winter, A. L.; Hicks, J. A.;
1668 Schlater, J. L. Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer

- 1669 calves and associated management practices on US dairy operations, Journal of Dairy
1670 Science, v. 92, n. 8, p. 3973-3980, 2009.
- 1671 Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of
1672 antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. 2015 Jan;13(1):42-51. doi:
1673 10.1038/nrmicro3380.
- 1674 Blowey, R. W., & Weaver, A. D. (2011). Neonatal disorders. Color Atlas of Diseases
1675 and Disorders of Cattle, 13–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7234-3602-7.00008-X>.
- 1676 Cardona Á. J., Álvarez P. J., & Arrieta B. G. Aislamiento e identificación de agentes
1677 bacterianos productores de onfalitis en terneros del departamento de córdoba. Revista
1678 U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica. v.14, n. 2, p. 95 – 99, 2011.
- 1679 Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI. 2020a. Performance Standards for
1680 Antimicrobial Disk and dilution Susceptibility Test for Bacteria isolated from Animals
1681 (CLSI VET 015). 5th edition. Wayne, PA. 250p.
- 1682 Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI. 2020b. Performance standards of
1683 Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th Edition. Wayne, PA. 332p.
- 1684 Constable Pd, Hinchliff Kw, Done S, Gruenberg W. Veterinary medicine: a textbook of
1685 the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 11th ed. Philadelphia: Saunders
1686 Ltd; 2016.
- 1687 Drzewiecka D. Significance and Roles of Proteus spp. Bacteria in Natural
1688 Environments. Microb Ecol. 2016;72(4):741-758. doi:10.1007/s00248-015-0720-6.
- 1689 Elad, D., & Segal, E. (2018). Diagnostic Aspects of Veterinary and Human
1690 Aspergillosis. Frontiers in microbiology, 9, 1303.
1691 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01303>.
- 1692 Faradonbeh, Y. K. & Faradonbeh, M. K. Evaluate the risk factors umbilical cord
1693 bacterial infection in calves in Shahrekord city. Journal of Entomology and Zoology
1694 Studies, v. 4, n. 2, p. 162-166, 2016.
- 1695 Giguère, S., Prescott, J.F.; Dowling, P.M. 2013. Antimicrobial Therapy in Veterinary
1696 Medicine. Pages 26-42. 5th ed. Wiley Blackwell.
- 1697 Gonçalves JL, Tomazi T, Barreiro JR, Braga PA, Ferreira CR, Araújo Junior JP, Eberlin
1698 MN, dos Santos MV. 2014. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine
1699 intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight
1700 mass spectrometry. Vet Microbiol. 17;173(1-2):147-51. doi:
1701 10.1016/j.vetmic.2014.06.028. Epub 2014 Jul 7.
- 1702 Hintz, L. P.; Bertagnon, H. G.; Oliveira L. J. C. 2019. Avaliação de diferentes
1703 protocolos preventivos para onfalopatias em bovinos de corte recém-nascidos.
1704 PUBVET, 13:166.
- 1705 Kroemer S., Galland D., Guérin-Faublée V., Giboin H., Woehrlé-Fontaine F. (2012).
1706 Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory
1707 disease and mastitis in Europe. Vet. Rec. 170:53 10.1136/vr.100246.
- 1708 Lacaz C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, E.M. and Melo, N.T. Tratado de
1709 Micologia Médica, 9a ed., Sarvier, São Paulo, 2002.
- 1710 Marston, H. D., D. M. Dixon, J. M. Knisely, T. N. Palmore, and A.S. Fauci. 2016.
1711 Antimicrobial resistance. JAMA 316:1193–1204.
1712 <https://doi.org/10.1001/jama.2016.11764>.
- 1713 McCulloch, H., and E. M. Mamizuca. 2015. Staph ylococcus aureus. Pages 179–188 in
1714 Microbiologia. 6th ed. L. R. Trabulsi and F. Alterthum, ed. Atheneu, São Paulo, Brazil.

- 1715 Murray, C.J.L., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L. 2022. Global burden of
1716 bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet*. 19;[e-pub].
1717 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- 1718 Pachori, P., Gothwal, R., & Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance
1719 *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes & diseases*,
1720 6(2), 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.04.001>.
- 1721 Quinn, P. J.; Markey, B. K.; Leonard, F. C.; Fitzpatrick, E. S.; Fanning, S.; Hartigan, P.
1722 J. 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, 2nd edn. Wiley-Blackwell, UK.
1723 334–341.
- 1724 Reis, A. S. B.; Pinheiro, C. P.; Lopes, C. T. A.; Cerqueira, V. D.; Oliveira, C. M. C.;
1725 Duarte, M. D.; Barbosa, J. D. Onfalopatias em bezerros de rebanhos leiteiros no
1726 nordeste do estado do Pará. *Ciência Animal Brasileira*, In: VIII Congresso Brasileiro de
1727 Buiatria, 1, 2009, Belo Horizonte. *Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria*, Belo
1728 Horizonte, 2009. p. 29-34.
- 1729 Rengifo, S. A.; Silva, R. A.; Pereira, I. A.; Zegarra, J. Q.; Souza, M. M.; Botteon, R. C.
1730 C. M. Isolamento de agentes microbianos a partir de amostras de sangue e umbigo de
1731 bezerros mestiços neonatos. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*,
1732 v. 43, n. 4, p. 442-447, 2006.
- 1733 Ribeiro MG, Riseti RM, Bolaños CA, Caffaro KA, de Moraes AC, Lara GH, Zamproga
1734 TO, Paes AC, Listoni FJ, Franco MM. *Trueperella pyogenes* multispecies infections in
1735 domestic animals: a retrospective study of 144 cases (2002 to 2012). *Vet Q*. 2015
1736 Jun;35(2):82-7. doi: 10.1080/01652176.2015.1022667.
- 1737 Rombach, S., Seino, C. H., Bombardelli, J. A.; Benesi, F. J. Avaliação microbiológica
1738 de processos inflamatórios umbilicais em bezerros com até 30 dias de vida. In:
1739 SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA
1740 USP, 22., 2014, São Paulo. Resumos. São Paulo: USP, 2014. Disponível em:
1741 <https://uspdigital.usp.br/siicusp/siicPublicacao.jsp?codmnu=7210>.
- 1742 Ruegg PL (2017) A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention.
1743 *J Dairy Sci* 100:10381–10397.
- 1744 Salci H, Ozdemir Salci E.S, Ozakin C, Seyrek Intas K. A brief study on hematological,
1745 sero-biochemical and microbiological results of umbilical lesions in calves. *Inter. J. Vet.*
1746 *Sci*. 2017;6:86–89.
- 1747 Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiaczcyk, M.,
1748 Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. 2019. Virulence factors, prevalence and
1749 potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from
1750 different sources: recent reports. *Gut pathogens*, 11:10.
1751 <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>.
- 1752 Schauer, B.; Wald, R.; Urbantke, V.; Loncaric, I.; Baumgartner, M. Tracing Mastitis
1753 Pathogens—Epidemiological Investigations of a *Pseudomonas aeruginosa* Mastitis
1754 Outbreak in an Austrian Dairy Herd. *Animals* 2021, 11, 279.
1755 <https://doi.org/10.3390/ani11020279>
- 1756 Schönecker L, Schnyder P, Schüpbach-Regula G, Meylan M, Overesch G. 2020.
1757 Prevalence and antimicrobial resistance of opportunistic pathogens associated with
1758 bovine respiratory disease isolated from nasopharyngeal swabs of veal calves in
1759 Switzerland. *Prev Vet Med*. 185:105182. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105182.
- 1760 Steerforth DD, Van Winden S. 2018. Development of clinical sign-based scoring
1761 system for assessment of omphalitis in neonatal calves. *Vet Rec*. 2;182(19):549. doi:
1762 10.1136/vr.104213.

- 1763 Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A,
1764 Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial use in food animals. Proc Natl Acad Sci
1765 U S A. 2015 May 5;112(18):5649-54. doi: 10.1073/pnas.1503141112.
- 1766 Windeyer, M. C., K. E. Leslie, S. M. Godden, D. C. Hodgins, K. D. Lissemore, And S. J.
1767 Leblanc. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves
1768 up to 3 months of age. Preventive Veterinaria Medicine, v. 113, p. 231–240, 2014.
- 1769 Zappa et al. Antimicrobial multiple resistance index, minimum inhibitory concentrations,
1770 and extended-spectrum beta-lactamase producers of *Proteus mirabilis* and *Proteus*
1771 *vulgaris* strains isolated from domestic animals with various clinical manifestations of
1772 infection. Semina, v.38, p.775-790, 2017.
- 1773

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.; JANLL, 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.

2033

ANEXOS

2034 ANEXO 1. Comissão de ética – CEUA/ FMVZ/ Unesp, Botucatu.

ATESTADO

Atesto que o Projeto "Fatores de virulência extraentéricos em *Escherichia coli* isoladas de onfalopatias em bezerros" Protocolo CEUA 0129/2020, a ser conduzido por Lorryne de Sousa Araújo Martins, responsável/orientador Márcio Garcia Ribeiro, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/09/2020 a 01/03/2022
Nome Comum / Espécie / Linhagem	BOVINA / BOS TAURUS / Bezerros de propriedades destinadas ao leite
Raça	Holandês, Jersey, Girolanda, Mestiços
Nº de animais machos	75
Nº de animais fêmeas	75
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	55
Peso médio de animais fêmeas	45
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 2 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Região Sudeste e Sul

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 12/08/2020



JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

2035

2036

2037 **ANEXO 2.** Genes de virulência e sequências dos iniciadores para detecção de fatores
 2038 de virulência em *E. coli* extraintestinal (ExPEC) em isolados obtidos de bezerros com
 2039 infecções umbilicais.
 2040

Genes	Sequência dos iniciadores (5' → 3')	Referência
Adesinas		
<i>sfaDE</i>	F:CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA R:CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	LE BOUGUENEC et al. (1992)
<i>papA</i>	F:ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG R:CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	JOHNSON, STELL (2000)
<i>papC</i>	F:GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG R:ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	LE BOUGUENEC et al. (1992)
<i>afaBC</i>	F:GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC R:CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	LE BOUGUENEC et al. (1992)
Toxinas		
<i>hlyA</i>	F:AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT R:ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	YAMAMOTO et al. (1995)
<i>sat</i>	F:TCCTGGGACATAATGGCTGA R:GTGTCAGAACGGAATTGTC	EWERS et al. (2004)
<i>cnf1</i>	F: GAACTTATTAAGGATAGT R: CATTATTTATAACGCTG	BLANCO et al. (1996)
<i>cdt</i>	F:GAAARTAAATGGAAYAYAMATGTCCG R:AATCWCCWRSAAATCATCCAGTTA	TENNANT et al. (2009)
Sideróforos		
<i>iroN</i>	F:AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG R:GACGCCGACATTAAGACGCAG	JOHNSON et al. (2000)
<i>irp2</i>	F:AAGGATTCGCTGTTACCGGAC R:TCGTCCGGCAGCGTTTCTTCT	CZECZULIN et al. (1999)
<i>iucD</i>	F:AAGTGTCGATTTTATTGGTGTA R:CCATCCGATGTCAGTTTTCTG	HERRERO et al. (1988)
<i>ireA</i>	F:ATTGCCGTGATGTGTTCTGC R:CACGGATCAACTTCAATGCGT	EWERS et al. (2007)
Outros: Invasinas (<i>ibe</i>), e mecanismos de resistência ao soro (<i>traT</i> e <i>ompT</i>)		
<i>ibeA</i>	F:AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC R: TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	JOHNSON et al. (2000)
<i>ompT</i>	F: ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC R: CCCGGGTCATAGTGTTTCATC	JOHNSON et al. (2000)
<i>traT</i>	F:GGTGTGGTGCGATGAGCACAG R:CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	JOHNSON; STELL (2000)
<i>kpsMT II</i>	F:GCGCATTTGCTGATACTGTTG R:CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	JOHNSON; STELL (2000)

2041