

DETECÇÃO DE FÍMBRIAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DAS FEZES DE BEZERROS COM DIARRÉIA NA REGIÃO DE FEIRA DE SANTANA-BA.

Gilberto Matos Neto¹; Claudio Roberto Nobrega Amorim²;

1. Bolsista FAPESB / UEFS, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: matosgilberto@ymail.com

2. Orientador, Professor do Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia aplicada a Saúde Pública. Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), e-mail: amorim71@ibest.com.br

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli*, diarréia, bezerros

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é um dos agentes etiológicos mais freqüentemente isolados em casos de diarréia no homem e em diferentes espécies animais, principalmente bovinos e suínos jovens (Savadori *et al.*, 2003). A maioria das cepas de *E. coli* presentes no trato gastrointestinal são comensais não patogênicas, no entanto algumas amostras de *E. coli* bovina podem produzir toxinas Shiga-like (STx), termo-lábil (LT) ou termo-estável (ST), Fatores Necrosantes Citotóxicos (CNF1 e CNF2) e hemolisinas (α -Hly e E-Hly) (Blanco *et al.*, 1993). A diarréia em bezerros é uma síndrome que ocorre em muitos países do mundo, principalmente subdesenvolvidos, e é uma importante causa de perdas econômicas (Barragry, 1997). Dentre as linhagens de *E. coli* relacionadas a distúrbios entéricos, a ETEC é um dos principais agentes causadores de diarréia em bezerros até 60 dias (Menezes *et al.* 2003). A infecção produzida pelas ETEC resulta em diarréia devido à ação de uma ou mais enterotoxina, e pode causar severa desidratação e levar a morte. As ETEC podem produzir toxinas termo-lábeis (LT-1 e LT-2) e toxinas termo-estáveis (STa e STb). Amostras de *E. coli* também produzem uma grande variedade de adesinas que promovem a ligação da bactéria a receptores na superfície das células e a componentes da matriz extra-celular. A adesina fimbrial F5 (K99) desempenha um importante papel na colonização de ETEC às células epiteliais do intestino delgado de bezerros (Babai *et al.*, 1997). Outras fimbrias, F41 e F17, também tem sido identificadas em amostras de ETEC isoladas de bezerros com diarréia (Contrepolis *et al.*, 1998). Embora as amostras que causam infecções em humanos estejam bem caracterizadas, existem informações limitadas acerca daquelas que causam doenças em animais. A Bahia possui o maior rebanho bovino do nordeste e está se credenciando a exportar carnes para a Europa e Oriente e não há, até o presente momento, estudos epidemiológicos acerca da prevalência de colibaciloses no Estado. Portanto, faz-se necessário um estudo da identificação dos fatores de virulência presentes nos casos de diarréia em bezerros na região de Feira de Santana.

METODOLOGIA

Amostras fecais de bezerros com idade entre 0 e 3 meses de nascidos foram coletadas no período de agosto a dezembro de 2010, em diferentes fazendas da região de Feira de Santana, por técnicos da fazenda experimental da Faculdade de Medicina Veterinária da UFBA, Posteriormente, estas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia

Aplicada à Saúde Pública – LAMASP, da UEFS, para análise microbiológica. As amostras fecais foram diluídas em tampão fosfato pH 7,4, estéril e, em seguida, foram semeadas em meio de cultura Agar MacConkey sendo incubadas por 24hs a 37°C. Após o período de incubação foi possível o isolamento de colônias fermentadoras ou não de lactose. Dentre estas, 120 colônias, identificadas como fermentadoras de lactose, foram inoculadas em meio BHI (Brain-heart infusion broth) por 24hs a 37°C, para posterior realização de testes bioquímicos e identificação de possíveis amostras de *E. coli*. As colônias identificadas como sendo *E. coli* foram estocadas em meio LB Broth (Lennox) para a realização de estudos dos fatores de virulência no Laboratório de Fatores de Virulência em Bactérias – Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia (I.B.), UNICAMP. A extração do DNA bacteriano foi realizada conforme Blanco *et al.* (1997), com modificações. As amostras foram pré-cultivadas em meio TSB, a 37°C por 24h e depois semeadas no meio de cultura TSA (trypticase soy agar) e incubadas a 37°C por 24h para a obtenção de crescimento confluyente. Foi feita a coleta da amostra e esta suspensa em 300µl de tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8,0). Esta suspensão foi submetida à fervura, em banho-maria, a 100°C por 10 minutos para o rompimento da membrana bacteriana e a liberação do ácido nucléico. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 12000 rpm por 3 minutos, sendo o “pellet” descartado e o sobrenadante utilizado para a reação em cadeia da polimerase (PCR). Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel agarose 2% (Amershan Pharmacia Biotech/Suécia) em tampão Tris 2M, ácido acético 0,04M, EDTA 0,01M pH8 (TAE).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho objetivamos identificar os fatores de aderência de *E. coli* presentes em bezerros diarreiogênicos da região de Feira de Santana. Das 30 amostras de *E. coli* estudadas, foram encontrados 28 (93,3%) amostras positivas para pelo menos um dos fatores de aderência envolvidos neste estudo. Um resultado semelhante ao descrito por Rigobelo *et al.*, (2006). A fímbria K99 (F5) desempenha um importante papel na colonização de células epiteliais no intestino delgado de bovinos. Logo, é muito comum sua identificação em amostras de *E. coli* de bezerros diarreiogênicos (Figueiredo *et al.* 2004). Em 19 (63%) das amostras analisadas foi detectado o gene que codifica a fímbria K99. Observou-se também, a associação desta fímbria com as toxinas LT-2 e STx-1 e a fímbria F17, uma relação não encontrada em outros estudos (Blanco *et al.* 1988; Salvadori *et al.* 2003). A fímbria F17 foi identificada em 9 (30%) amostras, sendo encontrada também, associada as toxinas LT-2 e STx-1 (Tabela-4). Um resultado similar ao analisado por (Shimizu *et al.*, 1987; Leite *et al.*, 1988; Salvadori *et al.*, 2003). A relação entre F17 e K99 produzidas por uma mesma amostra de ETEC em bezerros é um fator de colonização que torna vacinas contra K99 ineficientes (Contrepolis *et al.*, 1998). Nenhuma amostra teve o gene amplificado para a fímbria F41, resultado semelhante ao de Salvadori *et al.*, (2003). Com base nos dados obtidos, foi possível verificar alguns fatores de aderência de *E. coli* comuns em bezerros com diarreia, contribuindo assim, para a análise do perfil de virulência de cepas patogênicas de *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia na região de Feira de Santana.

CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa mostraram que cepas de *E. coli* isoladas de bezerros diarreiogênicos da região de Feira de Santana, são produtoras de fatores de colonização. Estes resultados sugerem que é necessário um estudo mais aprofundado e com uma amostragem

maior para a identificação da prevalência dos fatores de virulência associados à colibacilose bovina na região.

REFERÊNCIAS

- ABDULAMIR, A. S., YOKE, T. S., NORDIN, N. AND ABU BAKAR, F. 2010. Detection and quantification of probiotic bacteria using optimized DNA extraction, traditional and real-time PCR methods in complex microbial communities. *African Journal of Biotechnology* 9:1481-1492.
- BABAI, R.; BLUM-OEHLER, G.; STERN, B.E.; ZON, E.Z. Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. *Fems Microbiol. Letts.*149:99-105,1997.
- BARRAGRY, T. Calf diarrhoea. *Irish Vet. J.* , 50:49 -58,1997.
- BLANCO, J.; GONZÁLES, E.A.; GARCIA, S.; BLANCO, M.; REGUEIRO, B.; BERNARDEZ, I. Producion of toxinsinby *Escherichia coli* strain isolated from calves with diarrhea in Galicia (North- western Spain). *Vet. Microbiol.*, 18:297-311, 1988.
- BLANCO, J. & BLANCO, M. *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origem humano y bovino, patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. In Servicio Pub. Diputacion Provincial, Lugo, Espanha. 1993.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUNOA, F.; JUÉREZ, A.; BLANCO, J. Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: Relationship with expression of adhesins and producyion of toxins. *Res. Microbiol.*, 148(9): 745-755. 1997.
- CONTREPOIS, M.; BERTIN, Y.; POHL, P.; PICARD, B.; GIREARDEAU, J.P. A study of relationships among F17 a producing enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Eschrihia coli* strains isolated from diarrheic calves. *Vet. Microbiol.*, 64:75-81, 1998.
- EWELL, L.P. Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Ann. Rev. Mirobiol.*, 34:465-496, 1980.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; LAGE, A.P.; PEREIRA, F.N.J.; LEITE, R.C. Passive immunity in cattle against enterotoxigenic *Escherichia coli*: serologic evaluation of a bacterin containing K99 and F41 fimbriae in colostrums of vaccinated females and calf serum. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.4, p.425-432, 2004.
- LEITE, D.S. et al. Production, purification and partial characterization of a new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 139: 295-306, 1988.
- MENEZES, C. A. et al. Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. *Brazilian Journal of Microbiology.* 34: 11-13, 2003
- PATON, J.C.& PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* v.11, p.450- 479, 1998.
- RIGOBELLO, E.C.; GAMEZ, H.J.; MARIN, J.M.; MACEDO, C.; AMBROSIN, J.A.; ÁVILA, F.A. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58:305-310, 2006.
- SALVADORI, M. R. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *J. Microbiol.*, 34:230-235, 2003.
- SHIMIZU, M.; SAKANO, T.; YAMAMOTO, J.; KITAJIMA, K. Incidence and some characteristics of fimbria FY and 31A of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 31:417-426, 1987.

