DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ADESINAS DAS AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE BEZERRO COM DIARRÉIA EM CRUZ DAS ALMAS, BAHIA.

Bruna de Jesus Mamona¹; Claudio Roberto Nóbrega Amorim²

1. Voluntário de Iniciação Científica, Graduanda em Bach. Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: bjmamona@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: amorim@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli*; colibacilose; adesinas.

INTRODUÇÃO

Escherichia coli é uma bactéria que coloniza o trato intestinal de vertebrados. Essa colonização pode, em alguns casos, levar à colibacilose, doença que apresenta como principal sintoma a diarreia. Pertencente à família *Enterobacteriaceae* é uma bactéria gram-negativa com formato de bastonete, anaeróbia facultativa, e tem como temperatura ideal para seu crescimento 37°C (Almeida, 2013; Pereira, 2016).

A patogenicidade de *E. coli* está relacionada a vários fatores de virulência, e a presença destes é utilizada para a classificação das cepas patogênicas (Almeida, 2013). *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) comumente é a causadora de diarreia em bezerros neonatos devido à sua eficiência em colonizar o trato intestinal do animal através da aderência das fímbrias e liberação de enterotoxinas (Reck, 2009).

As adesinas ou fímbrias, um dos fatores de virulência, são moléculas proteicas localizadas na superfície da bactéria que promovem a adesão às células do hospedeiro (Almeida, 2013). As fímbrias podem ser classificadas em manose resistentes (MR) quando a hemaglutinação ocorre na presença do carboidrato D-manose ou em manose sensíveis (MS) quando a hemaglutinação ocorre na ausência do carboidrato D-manose (Almeida, 2013). Os tipos de adesinas que ocorrem com frequência em cepas de ETEC que colonizam o trato intestinal de bezerros, são: K99 ou F5, F17 e F41 (Salvatori *et al.*, 2003).

Dessa maneira, o trabalho teve como objetivo detectar e identificar as adesinas presente nas amostras de *E. coli* coletadas de bezerros com diarreia na Bahia.

MATERIAIS E MÉTODOS

As análises foram feitas a partir de 27 amostras de fezes diarreicas de bezerros recém-nascidos que foram gentilmente cedidas pelo Professor Joselito Nunes Costa, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Recôncavo Baiano.

A *Escherichia coli* foi isolada a partir da diluição das fezes em meio tamponado pH 7,4, esterilizado e, posteriormente, semeadas em meio de cultura Agar MacConkey e incubadas a 37°C com uma duração de 24h. Após esse processo as bactérias foram separadas em fermentadoras ou não fermentadoras de lactose. As fermentadoras foram inoculadas em meio BHI por 24h a 37°C; sendo depois inoculadas no caldo EC contendo tubo de Durhan, para incubação a 45°C por 24hs em banho-maria. As culturas que apresentaram crescimento com presença de gás no tubo de Durhan foram semeadas no Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB). Sendo o EMB utilizado para isolamento primário de todas as espécies de bacilos entéricos Gram-negativos. As placas foram incubadas a 35° C durante 24h a 48hs, e foram selecionadas

colônias suspeitas de *E. coli* (colônias verdes metálicas ou enegrecidas) para a identificação bioquímica.

As provas bioquímicas foram realizadas com colônias suspeitas de cada amostra e consistem em: Utilização dos carboidratos (glicose, sacarose e lactose), produção de indol, prova do vermelho metila, prova de Voges-Proskauer, utilização do citrato, produção de uréase, descarboxilação da lisina e arginina, produção de fenilalanina desaminase, produção de sulfeto de hidrogênio, prova da motilidade. (Koneman, 2001)

Para a detecção de fímbrias manose resistentes, foi realizado o teste de micro hemaglutinação manose resistente (MHMR). Foram coletados eritrócitos de boi, cavalo, ovelha e humano utilizando solução anticoagulante de Alsevier e preservados à 4° C. As hemácias foram lavadas por quatro vezes com salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4, contendo 1% de manose (PBS-M) até a formação de sobrenadante transparente e utilizadas na concentração de 1%.

Para a realização do teste MHMR, foram utilizadas microplacas com 96 poços e base em U. As amostras de *E. coli* foram cultivadas em placas de petri contendo meio Minca (Guiné *et al.* 1977) modificado, adicionando peptona ao invés de casaminoácidos, à 37°C por 24 horas. A suspensão bacteriana foi diluída em PBS-M de 1:2 até 1:256. Posteriormente, foram adicionados 50 microlitros de suspensão de eritrócitos a 1%.

As placas foram incubadas por 2 horas, à 4°C. Após este intervalo de tempo, procedeu a leitura.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

A inoculação das amostras no Caldo EC mostrou crescimento, indicando a possibilidade de as amostras serem de *Escherichia coli*. Os resultados para os testes VM (vermelho de metila) e Indol foram positivos, Citrato de Simmons e VP (Vogis e Proskauer) apresentaram resultados negativos, ambos os resultados confirmaram que as amostras de fato, eram de *Escherichia coli*.

Das 27 amostras utilizadas, 23 (85,18%) apresentaram resultados positivos para pelo menos um tipo de eritrócito no teste de MHMR, sendo que, 14,81% das amostras aglutinaram com eritrócitos de cavalo, 7,4% com eritrócitos de humano, 22,22% com eritrócitos de bovino e 81,48% com eritrócitos de carneiro. Apenas 22,22% das amostras aglutinaram com mais de um tipo de hemácia testada na presença do açúcar D-manose, duas amostras hemaglutinaram em duas variedades sanguíneas, três amostras hemaglutinaram em três variedades e somente uma amostra aglutinou todos os tipos de eritrócitos (Tabela 1). O título dos resultados positivos para as amostras foram variadas, de 1/2 à 1/32, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados obtidos a partir do teste de micro hemaglutinação manose resistente aplicado às amostras coletadas de bezerros com diarreia.

Amostras	Eritrócitos			
	Cavalo	Humano	Bovino	Ovino
3399(1)	+ (1/32)	-	+ (1/16)	+ (1/8)
3399(3)	-	-	-	+ (1/2)
3399(4)	+ (1/8)	-	+ (1/16)	+ (1/8)
3399(5)	+ (1/32)	+ (1/4)	+ (1/32)	+ (1/8)

3718(1)	-	-	-	+ (1/2)
3718(3)	-	-	-	+ (1/2)
3718(4)	-	+ (1/16)	+ (1/2)	+ (1/8)
3718(5)	-	-	+ (1/16)	-
3247(2)	-	-	-	-
3247(3)	-	-	-	-
3247(4)	-	-	-	-
3247(5)	-	-	-	+ (1/8)
3376(1)	-	-	-	+ (1/8)
3376(2)	-	-	-	+ (1/8)
3376(3)	-	-	+ (1/4)	+ (1/8)
3376(4)	-	-	-	+ (1/4)
3376(5)	+ (1/16)	-	-	+ (1/2)
3350(1)	-	-	-	+ (1/2)
3350(2)	-	-	-	+ (1/4)
3350(3)	-	-	-	+ (1/2)
3350(4)	-	-	-	+ (1/2)
3350(5)	-	-	-	+ (1/8)
3776(3)	-	-	-	+ (1/4)
3776(4)	-	-	-	+ (1/4)
3776(5)	-	-	-	+ (1/4)
3680(1)	-	-	-	+ (1/8)
3680(3)	-	-	-	-

Legenda: (+) = positivo, (-) negativo, número entre parênteses indica o título do resultado positivo.

Analisando os resultados percebe-se que a grande maioria das amostras de *E.coli* aglutinaram hemácias de carneiro. Porém, segundo Duguid *et al.* (1972) teste de micro hemaglutinação com hemácias de ovinos possuem forte tendência a apresentarem resultados falso-positivos. Dessa forma, é mais seguro inferir que a maior chance de haver produção das fímbrias manose resistentes (MR) está em amostras que apresentam aglutinação com mais de uma variedade de eritrócito, ou que apresente somente aglutinação com um tipo de eritrócito que não seja de carneiro. Portanto, as amostras 3399(1), 3399(4), 3399(5), 3718(4), 3718(5), 3376(3) e 3376(5) apresentam algum tipo fimbrial MR.

Os tipos fímbrias comumente associados a cepas de ETEC que causam colibacilose em bovinos, levando a um quadro de diarreia, principalmente em bezerros neonatos, são F5, F41 e F17 (Salvatoriet *al.*, 2003). A fímbria F5 apresenta hemaglutinação manose resistente com hemácias de cavalo e carneiro e a F41, em presença de manose, aglutina com hemácias de humano, cobaio, cavalo e carneiro (Gaastra&Gaaf, 1982). Diante dos resultados, pode-se assumir que as amostras 3399(1), 3399(4), 3399(5), 3718(4) e 3376(5) possuem maior probabilidade de conter os tipos fímbrias F5 e F41.

Com exceção dos resultados positivos obtidos nas amostras frente às hemácias de carneiro, os resultados positivos para os demais tipos de eritrócitos foram baixos. Isto não é um indicador decisivo de ausência de fímbrias, existindo a possibilidade de que as condições do meio como pH, quantidade de nutrientes, temperatura, entre outros fatores, não foram adequadas para a expressão do tipo fimbrial que as mesmas apresentam.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do resultado do trabalho, é possível concluir que algumas das amostras analisadas apresentam fímbrias manose resistentes, podendo ser do tipo F5 e F41, comumente associadas à cepa patogênica de *Escherichia coli* enterotoxigênica. Para maiores confirmações é necessária a aplicação da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para identificar os tipos fimbriais de todas as amostras e, assim, confirmar ou não a presença de ETEC, e elucidar quais os fatores que levaram ao quadro de diarreia em bezerros no Recôncavo Baiano.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. M. S. 2013. Características biológicas e antigênicas de *Escherichia coli* com ênfase aos genes de virulência. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás. Goiânia.

DUGUID, J. P. *et al.* 1978. The fimbrial and non- fimbrialhaemagglutinins of *Escherichia coli*. Journal of Medical Microbiology. 12: 213-228.

GAASTRA, W. & DE GRAAF, F. K. 1982. Host -specific fimbrialadhesins of noninvasive *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev. 46 (2): 129-161.

GUINÉE, P. A. M *et al.* 1977. Improved Mincamédium for detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 15: 676-678.

KONEMAN, E.W. *et al.* Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p.1465.

PEREIRA, D. A. *et al.* 2016. Virulence factors of *Escherichia coli* in relation to the importance of vaccination in pigs. Ciência Rural 46(8): 1430-1437.

RECK, M. V. M. 2009. Diarréia neonatal bovina. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. Porto Alegre.

SALVADORI, M. R. *et al.* 2003. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 34: 230-235.