

Comunicação

[Communication]

Caracterização genotípica de amostras *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina

[Genotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from cows with mastitis]

B.G. Castro¹, M.M.S. Souza², A.H. Régua-Mangia³, A.J. Bittencourt²

¹UFMT – Campus Universitário de Sinop – ICS
Av. Alexandre Ferronato 1200B
78550-000 - Sinop, MT

²UFRRJ – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Rio de Janeiro, RJ

³Fundação Instituto Oswaldo Cruz – ENSP – Instituto de Ciências Biológicas

A mastite bovina é considerada a doença que acarreta grandes prejuízos à produção leiteira. Dentre os agentes causadores desta enfermidade, destaca-se a espécie *Escherichia coli*, descrita como um dos mais prevalentes microrganismos causadores da mastite bovina de origem ambiental (Shpigel et al., 1998).

No Brasil, são limitadas as pesquisas sobre fatores de virulência, principalmente os estudos que abordam aspectos da diversidade genética em estirpes de *E. coli* isoladas de mastite bovina (Lira et al., 2004). A *E. coli* Shiga-Toxigênica (STEC) é a linhagem que mais está associada à bovinocultura, pois tem sido isolada frequentemente na carne e no leite de bovinos clinicamente saudáveis (Caprioli et al., 2006). Este estudo teve como objetivo realizar a tipificação genotípica e estimar prevalência de STE em amostras de *Escherichia coli*, proveniente de casos de mastite bovina em municípios do estado do Rio de Janeiro.

Foram visitadas 10 propriedades rurais nos municípios de Barra Mansa e Resende, estado do Rio de Janeiro. Foram examinadas, pelo *California Mastitis Test*, todas as vacas em linha de ordenha, coletando-se amostras positivas para isolamento e identificação, seguindo metodologia descrita por Koneman et al. (2001). As amostras de *E. coli* foram comparadas genotipicamente por meio da técnica de amplificação randômica de DNA polimerase (RAPD) (Pacheco et al., 1997).

Após a etapa de isolamento e identificação da microbiota bacteriana, foram separadas as amostras de *E. coli* identificadas para análise do polimorfismo dos segmentos de DNA obtidos por amplificação randômica *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD-PCR). As etapas de extração do DNA bacteriano, da reação dos ensaios de amplificação randômica do DNA polimórfico e da análise dos produtos da amplificação foram realizadas de acordo com o método proposto por Pacheco et al. (1997).

Para o ajuste da concentração das células bacterianas, uma alíquota de 20µL do crescimento bacteriano em caldo de tripticaseína de soja (TSB-BBL) a 37°C/18-24h foi diluída a 1:10 em água destilada ou salina para determinação da densidade ótica (DO) em 600nm. Para a DO de 0.4 de absorvância, uma alíquota de 200µL foi centrifugada e ressuspendida em 900µL de água destilada estéril. A suspensão foi submetida à fervura por 10min, e o lisado bacteriano foi rapidamente centrifugado (spin) e utilizado como fonte de DNA nas reações de amplificação.

Um volume de 3µL do lisado bacteriano foi utilizado nas reações de amplificação juntamente com outros reagentes: 20mM Tris-HCl (pH 8.4) (Fermentas, Burlington, Canadá), 50mM HCl, 4mM de MgCl₂ (Fermentas, Burlington, Canadá), 250µM (cada) dNTP (ABgene, Epsom, Reino Unido), 30pmol de iniciador e 1U Taq polimerase (Fermentas, Burlington, Canadá).

Recebido em 19 de maio de 2010

Aceito em 28 de fevereiro de 2011

E-mail: castrobg@ufmt.br

Foram utilizados os seguintes iniciadores: 1254 (5' CCGCAGCCAA3'), M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'), e A04 (5'-AATCGGGCTG-3'). A reação foi programada para desnaturação inicial de 94°C por 1min; seguida de quatro ciclos de 94°C por 5min, 37°C por 5min e 72°C por 5min, 30 ciclos de 94°C por 1min, 37°C por 1min e 72°C por 2min e, extensão final de 72°C por 10min.

A amplificação simultânea dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*, para detectar presença de STEC dentre os isolados, foi feita segundo China et al. (1996), em que as amostras de *E. coli* foram semeadas em 5mL de Caldo Müeller Hinton (Merck) a 37°C por 18 a 24h. Após o período de incubação, 300µL da cultura foram centrifugados por 30s em microcentrífuga, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspenso em 50µL de água destilada estéril e submetido à fervura por 10min. O lisado bacteriano foi centrifugado por 30s em microcentrífuga, e o sobrenadante coletado e usado como fonte de DNA.

Para a reação de PCR, foram utilizados 1U de *Taq* Polimerase (Fermentas, Burlington, Canadá), 5µL de 2mM deoxinucleotídeo trifosfato- DNTP (ABgene, Epsom, Reino Unido), 5mL de tampão 10X buffer (100mM Tris-HCl [pH 8.8], 15mM MgCl₂, 500mM KCl, 1% Triton X-100) (Fermentas, Burlington, Canadá), 0.5mL de cada iniciador (40mM) (Bioneer, Seul, Coréia do Sul), e 5µL de DNA para um volume final de 50µL. As reações foram realizadas em um termociclador Eppendorf Master Cycler, programado para 94°C por 5min, seguido de 30 ciclos por 94°C por 30s, 50°C por 30s e 72°C por 30s. As amostras de *E. coli* E40705 (*stx1* e *eae* positivos) e E30121 (*stx2* e *eae* positivos) foram incluídas no estudo como controle de reação.

Os produtos da reação das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Os perfis de amplificação foram submetidos à análise visual e automatizada, com auxílio do *software* UVI *soft image acquisition and analysis software*, empregando-se o programa UVIPro bandmap versão 11.9 (UVItec, Cambridge, Reino Unido).

Os resultados revelaram que a taxa de ocorrência de mastite no leite das 273 vacas incluídas no

estudo foi de 20,6%. Dentre os agentes isolados, 14 amostras (15,2%) foram identificadas como *E. coli*, sendo 13 isoladas de casos de mastite subclínica e apenas uma de caso de mastite clínica. Foram observadas amostras geneticamente relacionadas aos casos de mastite bovina. Os grupos clonais isolados da propriedade 1 representavam amostras de diferentes animais. Além destas, foi observada similaridade entre amostras das propriedades 4, 7 e 9, que compreendiam isolados distintos de uma mesma vaca.

De acordo com os resultados obtidos nos casos de mastite bovina causados por *E. coli* submetidas à reação em cadeia de polimerase – Multiplex (Multiplex-PCR), 14,3% apresentavam gene para produção de toxina Shiga, sendo detectados os três genes.

Os resultados confirmam o observado por Lira et al. (2004). Esses autores verificaram incidência de 12,0% de STEC nas amostras de leite com mastite, cujo agente etiológico era *E. coli*. No entanto, os mesmos autores relataram maior ocorrência de genes associados às STEC, em que metade das amostras apresentavam o gene *eae*, enquanto, no presente estudo, nenhuma das duas amostras apresentaram o referido gene. Este fato pode ser explicado pela maior quantidade de amostras de *E. coli* avaliadas por Lira et al. (2004), pois a taxa de incidência de STEC nas amostras de leite foi similar.

A observação de padrões eletroforéticos iguais entre si de amostras bacterianas isoladas de vacas de uma mesma propriedade sugere a disseminação do referido agente bacteriano no rebanho, fato que pode ser explicado pelas precárias condições higiênico-sanitárias das fazendas visitadas.

As amostras onde foram detectados os genes foram obtidas de quartos mamários distintos de uma mesma vaca, e, de acordo com o estudo molecular, são organismos com o mesmo perfil eletroforético, fato que evidencia a necessidade da constante monitorização dos rebanhos bovinos leiteiros.

Este estudo tem grande importância, principalmente, no que se refere à vigilância sanitária de produtos alimentícios, visto que é comum o consumo de leite recém-ordenhado

Caracterização genotípica...

pelos trabalhadores rurais, e é frequente a venda informal de leite de algumas das propriedades visitadas em mercados vizinhos. Esse fato aumenta a possibilidade de ingestão de agentes patogênicos pelo consumo desses produtos, sem o prévio tratamento térmico. Os resultados obtidos contribuem para esclarecer aspectos

biogenéticos-epidemiológicos desse patógeno e fornecer subsídios para ações de monitoramento e controle dessas infecções.

Palavras-chave: vaca, mastite, *Escherichia coli*, STEC

ABSTRACT

Escherichia coli samples isolated from cases of dairy mastitis in municipalities of Rio de Janeiro State, Brazil, were genotypically compared and Shiga-toxin genes were detected and their prevalence evaluated. Genetically related samples were verified and the referred genes were detected in 14.28% of the cases.

Keywords: dairy cattle, mastitis, *Escherichia coli*, STEC

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; SCHEUTZ, F. et al. Pathogenesis of verocytotoxin/Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection (conference summary). *Emerg. Infect. Dis.*, v.12, 2006.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex *in vitro* amplification of virulence-associated genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, p. 3462-3465, 1996.

KONEMAN, E.W.; JANDA, S.D.; SCHRECKENBERGER, W.M. et al. *Diagnóstico microbiológico*. MEDSI: Rio de Janeiro, 2001. 1465p.

LIRA, W.M.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. The incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. *J. Appl. Microbiol.*, v.97, p.861-866, 2004.

PACHECO, A.B.F.; GUTH, B.E.C.; SOARES, K.C.C. et al. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.1521-1525, 1997.

SHPIGEL, N.Y.; WINKLER, M.; ZIV, G.A. Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, v.35, p.1-9, 1998.