

## Fatores de virulência das amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia na região de Feira de Santana, Bahia\*

Karine de Oliveira Costa<sup>1</sup>, Fernando Alzamora Filho<sup>2</sup>, Joselito Nunes Costa<sup>3</sup>, Cláudio Roberto Nóbrega Amorim<sup>4\*</sup>, Tomonasa Yano<sup>5</sup> e Rogério Arcuri Conceição<sup>5</sup>.

**ABSTRACT.** Costa K.O., Alzamora Filho F., Costa J.N., Amorim C.R.N., Yano T. & Conceição R.A. [Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in the region of Feira de Santana, Bahia.] Fatores de virulência das amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia na região de Feira de Santana, Bahia. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 36(4):430-436, 2014. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, BR 116 norte, Km 3, Feira de Santana, BA 44032-560, Brasil. E-mail: amorim71@ig.com.br

*Escherichia coli* is a Gram-negative bacterium most commonly isolated from intra and extraintestinal infections in both man and in other animals such as pigs and calves. Six distinct groups of *E. coli* can be identified by the type of toxin and the clinical signals they produce. Among these, *E. coli* enterotoxigenic (ETEC) is the most commonly found and produces two types of toxin: heat-labile (LT-I and LT-II) and heat-stable (STa and STb). Another virulence factor of *E. coli* is the presence of adhesive antigens that enable the bacterium linking to host cells. Adhesins more frequently found in bacteria that produces diarrhea in cattle are F5 (K99), F17 and F41. The objective of this study was to identify by PCR virulence factors present in *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeagenic stool of calves from the region of Feira de Santana, Bahia, Brazil. Of the thirty isolated strains, twenty-eight (93.3%) were positive for at least one of the virulence factors studied in this work. Enterotoxin genes Stx-1 and LT-2 were present in 40% and 46.6% of the strains, while fimbrial adhesins genes F5 and F17, were present in 63% and 30% of the strains, respectively. Cytotoxic Necrotizing Factors (CNF1 and CNF2), STa and F41 genes were not found in any of the strains. Biological phenotypic characterization using *in vitro* cultivated Vero cells which indicates either the presence of Stx and LT genes were positive in 40% and 46.6% of the strains, respectively.

**KEY WORDS.** Calves, diarrhea, *Escherichia coli*, virulence factors.

**RESUMO.** *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa mais comumente isolada de infecções intra e extraintestinais, tanto no homem quanto em outros animais tais como suínos e bezerros. Seis grupos

distintos de *E. coli* podem ser identificado pelo tipo de toxina que produzem e pelos sinais clínicos que causam. Dentre estes, está *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), que produz comumente dois tipos de

\* Recebido em 10 de abril de 2013.

Aceito para publicação em 20 de fevereiro de 2014.

<sup>1</sup> Bióloga, Especialização, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, BR 116 norte, Km 3, Feira de Santana, BA 44032-560, Brasil. E-mail: karinedeoliveira@hotmail.com

<sup>2</sup> Médico-veterinário, DSc. Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré de Andrade, Pavilhão Jorge Amado, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-900, Brasil. E-mail: alzaafilho@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Médico-veterinário, DSc. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Rua Rui Barbosa, 710, Campus Universitário, Cruz das Almas, BA 44380-000, Brasil. E-mail: joselitonc@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Biólogo, DSc. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, BR 116 norte, Km 3, Feira de Santana, BA 44032-560. \* Autor para correspondência, E-mail: amorim71@ig.com.br

<sup>5</sup> Agrônomo, DSc, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Campinas, SP 13083-862, Brasil.

toxinas: termo-lábil (LT-I e LT-II) e termo-estável (STa e STb). Outro fator de virulência de *E. coli* é a presença de antígenos de aderência, muitas vezes estruturas do tipo fímbria, que permitem a ligação da bactéria às células do hospedeiro. As adesinas mais frequentemente encontradas em bovinos são F5 (K99), F17 e F41. O objetivo do presente estudo foi identificar os fatores de virulência presentes nas amostras de *E. coli* isoladas de bezerros com diarreia na região de Feira de Santana, Bahia, Brasil. Das trinta cepas isoladas, 28 (93,3%) foram positivas para pelo menos um dos fatores de virulência envolvidos no presente trabalho. Genes da enterotoxina Stx-1 e LT-2 estavam presentes em 40% e 46,6% dos isolados, enquanto que os genes das adesinas fimbriais F5 e F17, estavam presentes em 63% e 30% das cepas, respectivamente. Genes dos fatores citotóxicos necrosantes (CNF1 e CNF2), STa e F41 não foram encontrados em nenhuma das cepas. Caracterização biológica fenotípica utilizando cultivo *in vitro* de células Vero, no qual indica também a presença de genes de STx e LT foram positivas em 40% e 46,6% das cepas, respectivamente.

**PALAVRAS-CHAVE.** Bezerros, diarreia, *Escherichia coli*, fatores de virulência.

## INTRODUÇÃO

A diarreia em bezerros é uma síndrome que ocorre em muitos países do mundo, principalmente subdesenvolvidos (Barragry 1997) sendo uma importante causa de perdas econômicas diretas e indiretas, devido à mortalidade de animais, reduzida desempenho, aumentando gastos com medicamentos, aumento da resistência da população bacteriana a antimicrobianos, existência de animais-reservatórios de patógenos, entre outros (Oliveira 2000).

*Escherichia coli* é um dos agentes etiológicos mais frequentemente isolado em casos de diarreia em seres humanos e em outras 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, mas existem amostras que podem ser patogênicas devido à capacidade que possuem de aderir a e/ou invadir células intestinais e produzir toxinas (Nataro & Kaper 1998, Amorim, 2002). A patogenicidade de *E. coli* é um mecanismo multifatorial e complexo que envolve vários fatores de virulência de acordo com o sorotipo da cepa pesquisada. Cepas patogênicas isoladas de bovinos podem apresentar fatores de virulência como lipopolissacarídeos (LPS), adesinas, fatores necrosantes citotóxicos (CNF1 e

CNF2), hemolisinas (alfa e beta), citotoxinas Shiga-like (STx1 e STx2) e enterotoxinas (STa, STb, LT1 e LT2) (González & Blanco 1987, Hirsh & Zee 2003).

As diferentes cepas de *E. coli* responsáveis principalmente por distúrbios entéricos podem ser agrupadas em seis tipos, de acordo com a capacidade de produção de determinadas toxinas, de invasão celular ou de manifestação de sintomas clínicos no homem e/ou animais, sendo elas: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasoras (EIEC), *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), *E. coli* enteroagregativas (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Nataro & Kaper 1998).

Dentre as linhagens de *E. coli* relacionadas a distúrbios entéricos, a ETEC é um dos principais agentes causadores de diarreia em bezerros com até 60 dias de idade. O processo infeccioso produzido por ETECs resulta em diarreia, devido à ação de uma ou mais enterotoxinas, o que pode causar severa desidratação e levar o animal à morte. As ETECs podem produzir toxinas termolábeis (LT-1 e LT-2) e toxinas termoestáveis (STa e STb) (Menezes et al. 2003). Além das toxinas, estas cepas apresentam a capacidade de expressar adesinas, fimbriais ou não, que permitem que as mesmas liguem-se às células epiteliais intestinais e, conseqüentemente, causar o efeito biológico (diarreia) devido à expressão da(s) toxina(s) (Smith & Gyles 1970, Smith & Lingood 1972). As adesinas expressas na superfície bacterianas, também são conhecidas como fatores de colonização (CFA), os quais são de natureza proteica, imunogênicas, reconhecendo receptores específicos nas células intestinais (Trabulsi 2004). Os CFAs identificados, até agora, em amostras de ETEC isoladas de bezerros são as adesinas fimbriais F5 (K99), F41 e F17 (Babai et al. 1997, Contrepolis et al. 1998, Salvadori et al. 2003).

No Brasil, a colibacilose (diarreia) de bezerros é muito comum, embora não se saiba sua prevalência exata devido às disparidades existentes nas diferentes regiões criadoras de gado. Também, não se tem a prevalência dos genes presentes nestas regiões exatamente devido às disparidades existentes. Salvadori et al. (2003) e Rigobelo et al. (2006), realizaram estudos na região Centro Oeste do Brasil e Noroeste de São Paulo, respectivamente, e observaram a presença de amostras de *E. coli* produtoras de toxinas.

A Bahia possui o maior rebanho bovino do Nordeste e está sendo credenciada para exportar carnes para a Europa e Oriente e não há, até o presente momento, estudos epidemiológicos acerca da pre-

valência de colibaciloses no Estado. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi identificar a presença de fatores de virulência em amostras de *E. coli* isoladas de fezes diarreicas de bezerros na região de Feira de Santana, BA.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trinta amostras fecais de bezerros com idade entre zero e três meses de idade foram coletadas no período de agosto a dezembro de 2010, em diferentes fazendas da região de Feira de Santana, BA e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Aplicada à Saúde Pública - LAMASP, da UEFS, para análise microbiológica. As amostras utilizadas como controles positivos e negativos, nesse estudo, foram as linhagens O26:H11 (STx1+), O157:H- (STx2+), H10407 (LT-1+, STa+), PCD (LT-2+), 40MR48 (CNF1+), B26a (CNF2+), O141:K- (F41+), O101:K- (F5+), ATT25 (F17a+) e K12C600 (cepa não toxigênica).

As amostras fecais foram diluídas em tampão fosfato pH 7,4, esterilizado, semeadas em meio de cultura Ágar MacConkey e incubadas por 24h a 37°C. Após o período de incubação, foi possível o isolamento de colônias fermentadoras ou não de lactose. As colônias lactose positivas foram inoculadas em meio BHI (Brain-heart infusion broth) por 24h a 37°C, para posterior identificação bioquímica de Enterobacteriaceae.

As colônias crescidas em BHI foram semeadas nos meios EPM, MILi e Citrato de Simmons, conforme metodologia descrita por Johnson & Case (1995), sendo feita a verificação da atividade metabólica das bactérias sobre os substratos presentes nos referidos meios de cultura. As colônias identificadas como *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 do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da Unicamp, Campinas, São Paulo.

A reação da PCR foi realizada em microtubos individuais e adicionaram-se 3mL de tampão (10mM Tris-HCl com pH 8,3 e 50mM KCl); 3mL de MgCl<sub>2</sub> 25mM; 0,25mL de dNTP (Fermentas, 5mM); 1mL de cada *primer* (Tabela 1) reverso e direto (20mM) e 0,25mL de enzima *Taq* polimerase 1U/mL (Fermentas). Cada reação conteve 50pg de DNA genômico e teve seu volume ajustado para 30mL com água MiliQ estéril.

As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) por 30 ciclos, sendo: desnaturação a 94°C por 5min; anelamento por 1 min; e extensão de 72°C por 7 min, finalizando a 4°C e foram realizadas em triplicata e comparas a cepas de *E. coli* padrão para cada gene pesquisado, mantidas na bacterioteca.

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) e a corrida foi realizada a 100V por 1h. A identificação da banda foi feita mediante incubação em solução de Brometo de etídio (1,5mg/mL) por 15 minutos e examinadas em transiluminador de luz UV 302nm.

No cultivo celular, utilizaram-se células Vero provenientes de rim de macaco verde africano, obtidas dos estoques do Laboratório de Cultura Celular (Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Unicamp), que foram lavadas com meio Eagle (Cultilab) e transferidas para uma garrafa de cultura de células contendo meio Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab). Os frascos de cultura foram incubados em estufa a 37°C por 48h, até formação de tapete celular. Após esse período, o meio de cultura foi descartado, sendo adicionada à cultura celular a

Tabela 1. Iniciadores utilizados no estudo de amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia.

Primers <sup>a</sup>	Oligonucleotídeos iniciadores	Tamanho (pb)	Anelamento Temp. (°C)	Referências
CNF1	5-CCACCTGCAGCAACAAGAGG-3 5-GAACTTATTAAGGATAGT-3	543	45 °C	Blanco et al. (1994)
CNF2	5-CATTATTTATAACGCTG-3 5-AATCTAATTAAGAGAAC-3	543	44 °C	Blanco et al. (1994)
LT-1	5-CATTATTTATAACGCTG-3 5-TATCCCTCTATATGCACAG-3	480	48 °C	Caprioli et al. (1987)
LT-2	5-CIGTAGTGGAAAGCTGTTATA-3 5-AGATATAATGATGGATATGTATC-3	300	48 °C	Roosendal et al. (1984)
STa	5-TAACCCCTCGAAAATAAATCTC-3 5-TCCGTGAAAACAACATGACGG-3	244	60 °C	Shimizu et al. (1987)
STx-1	5-ATAACATCCAGCACAGGCAG-3 5-AGGITGCAGCTCTTTCAATA-3	364	57 °C	Jackson et al. (1987)
STx-2	5-TGCAAAACAAATTATCCCCTGAG-3 5-GGGCAGTATTTTGCTGTGGA-3	386	59 °C	Jackson et al. (1987)
F5 (K99)	5-GTATCTGCCTGAAGCTGAA-3 5-TGGGACTACCAATGCTTCTG-3	450	60 °C	Paton & Paton (1998)
F17	5-TATCCACCATTAGACGGAGC-3 5-GCAGAAAATTCAATTTATCCTTGG-3	537	65 °C	Babai et al. (1997)
F41	5-CTGATAAGCGATGGTGTAATTAAC-3 5-GAGGGACTTTCATCTTTAG-3	431	56 °C	Elwell L.P. (1980)

<sup>a</sup>descrição, sequência, temperatura de anelamento, tamanho do produto amplificado e referência de cada iniciador

solução de Tripsina-versene (ATV, IAL) para o descolamento do tapete celular. As células foram então ressuspensas em meio Eagle acrescido de 10% de SBF, em número estimado de  $2,5 \times 10^5$  células/mL. A suspensão de células foi distribuída em microplacas de 96 cavidades, em volume de 0,1mL por cavidade e incubadas em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 24h a 37°C (Yano et al. 1986).

Para a produção de toxinas de *E. coli*, no intuito da análise do efeito citotóxico e citotônico em células Vero, as amostras foram cultivadas no meio de cultura TSB (*Tryptone Soya Broth*) e incubadas a 37°C por 18 horas com agitação a 150rpm. Centrifugou-se a cultura a 10.000rpm por 15 minutos e os sobrenadantes filtrados em membrana (Millipore 0,22 $\mu\text{m}$ ).

A produção de toxina foi detectada através do efeito citopático em células Vero como descrito por Yano et al. (1986). O sobrenadante de cada cultura foi aplicado na monocamada de células Vero, em meio de MEM (meio mínimo essencial de Eagle). As placas de células foram incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Os efeitos citotônico e citotóxico nas células foram observados após 24 horas em microscópio de contraste de fase invertido (Nikon).

Para a avaliação da produção de hemolisina, as amostras de *E. coli* foram semeadas em ágar sangue e incubadas a 37°C por 18 horas para a detecção de  $\alpha$ -Hly e para a detecção de E-Hly, foi utilizado o meio básico de Beutin contendo  $\text{CaCl}_2$  (MERK) e eritrócitos de carneiro lavados. As amostras foram incubadas a 37°C por 18 horas (Beutin 1991).

## RESULTADOS

Das 30 amostras fecais coletadas, foram isoladas 120 colônias fermentadoras de lactose. Pela análise

se da série bioquímica para Enterobacteriaceae, foi confirmada a presença de *E. coli* em 30 (25%) amostras fermentadoras de lactose.

Nas Tabelas 2 e 3 observam-se a prevalência de amostras bacterianas portadoras de genes de virulência de ETEC, isoladas dos bezerros diarreogênicos. Das 30 amostras submetidas à PCR, 26 (86,6%) apresentaram produtos de amplificação com migração eletroforética compatíveis com a dos frag-

Tabela 2. Amostras de *Escherichia coli* toxigênicas isoladas de bezerros com diarreia

Toxinas	Nº (%)
CNF1	0
CNF2	0
LT-1	0
LT-2	14 (46,6)
STx-1	12 (40,0)
STx-2	0
STa	0
LT-2 e STx-1	4(13,3)

Tabela 3. Amostras de *Escherichia coli* produtoras de adesinas fimbriais isoladas de bezerros com diarreia e associadas com toxinas

Fímbria	Nº (%)
F17	9 (30,0)
K99	19 (63,0)
F41	0
F17 e K99	9 (30,0)
F17 e LT-2	9 (30,0)
F17 e STx-1	5 (16,6)
F17, LT2 e K99	4 (15,4)
F17, LT-2, STx-1 e K99	5 (13,3)

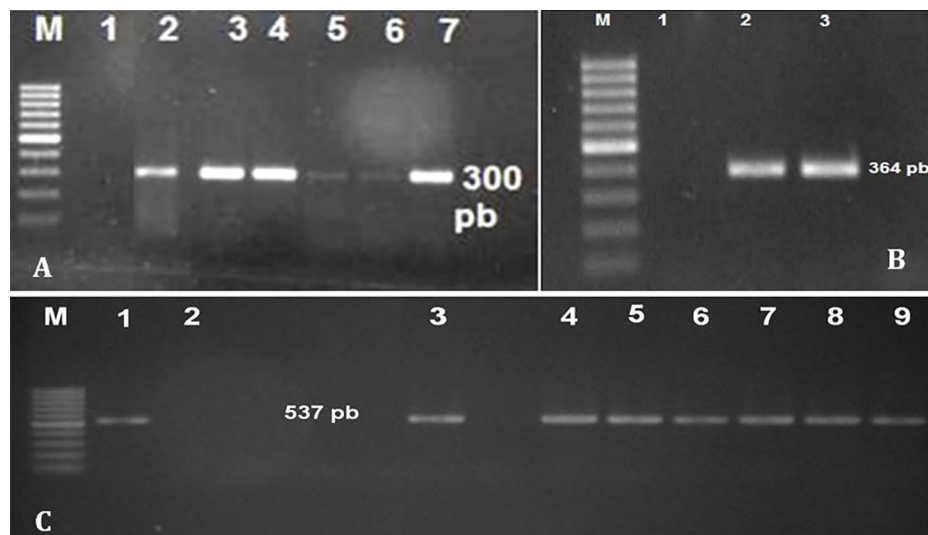


Figura 1. Gel de agarose (2%) representativo do perfil genotípico de virulência obtido através da PCR. (A) Gene LT-2. (M) Padrão de peso molecular de 100pb; (1) *Escherichia coli* K12 (controle negativo); (2) *E. coli* PCD(LT-2<sup>+</sup>) controle positivo; (3-7) amostras positivas para LT-2; (B) Gene STx-1. (M) Padrão de peso molecular de 100pb; (1) *E. coli* K12 (controle negativo); (2) *E. coli* O26:11(STx-1<sup>+</sup>) controle positivo; (3) pool de amostras positivas para STx-1; (C) Gene F17. (M) Padrão de peso molecular de 100pb; (1) *E. coli* ATT25 (F17a<sup>+</sup>) controle positivo; (2) *E. coli* K12 (controle negativo); (3-9) amostras positivas para F17.

mentos de amplificação dos genes Stx-1 e LT-2 e 28 (93,3%) foram compatíveis com os fragmentos dos genes K99 e F17 (Figura 1), presentes nas amostras controle positivo.

Os efeitos citopáticos em células Vero compatíveis com a produção de STx e LT foram encontrados em 12 (40%) e 14 (46,6%) das linhagens respectivamente (Tabela 2). Das trinta amostras testadas, 26 apresentaram algum tipo de efeito em células Vero e quatro não apresentaram efeito algum. A Figura 2 mostra os efeitos das diferentes toxinas produzidas pelas amostras em células Vero.

Não se detectou em nenhuma das 30 amostras estudadas a produção de  $\alpha$ -hemolisinas e enterohemolisinas.

## DISCUSSÃO

A colibacilose neonatal em bezerros é uma das mais importantes moléstias em termo de mortalidade, causando elevados prejuízos econômicos à pecuária brasileira. O principal grupo de *E. coli* responsável pela diarreia em bezerros é *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (Leomil et al. 2003, Rigoblo et al. 2006).

Para que as *Escherichia coli* sejam capazes de causar moléstias entéricas em bezerros é indispensável que a bactéria apresente pelo menos duas características principais: capacidade de aderir às células epiteliais do intestino, resultando na colonização e capacidade de produzir toxinas, relacionadas à enteropatogenicidade (Amorim 2002). Neste trabalho, das 30 amostras de *E. coli* estudadas de bezerros diarreio-gênicos, foram encontrados 28 (93,3%) amostras positivas para pelo menos um dos fatores de virulência envolvidos neste estudo. Um resultado semelhante ao descrito por Rigobelo et al. (2006).

Foi possível detectar 12 (40%) amostras positivas para o gene STx-1 mas nenhuma amostra positiva para o gene STx-2. Das amostras em estudo, nenhuma produziu enterohemolisinas, um resultado que diverge dos estudos de Salvadori et al. (2003) e Rigobelo et al. (2006), os quais demonstraram uma relação entre a presença do gene STx-1 e STx-2 e a produção de enterohemolisinas nas mesmas amostras. Todas as amostras positivas para o gene STx-1 apresentaram efeito citotóxico em células Vero como descrito por Yano et al. (1986).

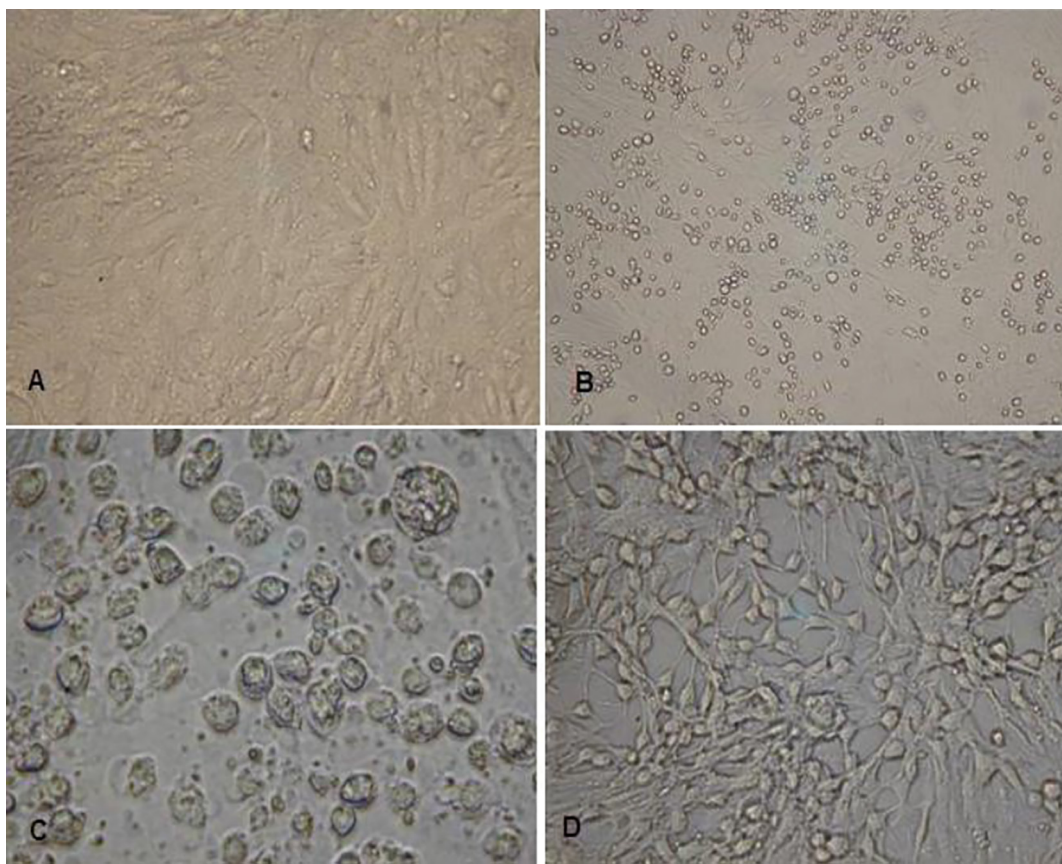


Figura 2. Efeitos das diferentes toxinas produzidas pelas amostras de *Escherichia coli* em células Vero (A) Controle negativo. Obj. 20X; (B) Célula apresentando efeito citotóxico de Stx após 12h. Obj. 20X; (C) célula apresentando efeito citotóxico de Stx após 24h. Obj. 40X; (D) Célula apresentando efeito citotônico de LT após 24h. Obj. 40X.

Salvadori et al. (2003) reportaram em seus estudos a relação do fator necrosante citotóxico (CNF1 e CNF2) com a produção de  $\alpha$ -hemolisinas, o que não foi observado no presente estudo. Nenhuma amostra foi positiva para a toxina LT-1. No entanto, foram encontrados 14 (46,6%) amostras positivas para LT-2 (Tabela 2), assim como, foram observados ausência de LT-1 e presença de LT-2 nos estudos de Salvadori et al. (2003) e Rigobelo et al. (2006).

A toxina LT-2 foi encontrada no Brasil, pela primeira vez, em bezerros com diarreia na região de Jaboticabal-SP (Ugrinovich et al. 2002). Hesham et al. (2010) descobriram um novo tipo desta toxina, a LT-2c, a qual foi isolada de uma amostra de *E. coli* de avestruz com diarreia. Esta nova toxina apresentou efeito citotônico em células Vero que é comum para LT-1 e não para LT-2. No presente estudo, foi possível observar células Vero com efeito compatível a LT-1, no entanto, todas as nossas amostras foram *lt-1* negativas na PCR. Contudo, a relação entre as amostras *lt-2* positivo e efeito citotônico em células Vero foi de 100%.

Em 5 (13,3%) das amostras de *E. coli*, observou-se a associação dos genes que codificam as toxinas LT-2 e STx-1, sendo uma relação similar ao encontrado por Salvadori et al. (2003). A toxina STa não foi encontrada em nenhuma das amostras estudadas, o que contrapõe os estudos de Rigobelo et al. (2006), que apresentou 25% desta toxina em seus estudos.

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 diarreogênicos (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. Um resultado similar ao analisado por (Shimizu et al. 1987, Leite et al. 1988, Salvadori et al. 2003). A presença das adesinas F17 e K99 produzidas por uma mesma amostra de ETEC em bezerros é fato que pode tornar 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 virulência 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, BA.

## CONCLUSÕES

Os resultados desta pesquisa demonstraram que cepas de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarreia da região de Feira de Santana são produtoras de toxinas e fatores de colonização.

Também foi detectada uma prevalência da toxina LT-2, tendo esta, apresentado efeito citotônico em células Vero, podendo pertencer ao subtipo c, descoberto recentemente.

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.

**Agradecimentos.** Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, Laboratório de Fatores de Virulência em Bactérias, Instituto de Biologia, Unicamp, por ter cedido às linhagens de *E. coli* utilizadas como controles.

## REFERÊNCIAS

- Amorim C.R.N. *Estudo da biologia da fímbria F42 produzida por Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC)*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2002. 80p. (Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000256990>>).
- Babai R., Blum-Oehler G., Stern B.E., Hacker J. & Ron 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.
- Beutin L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med. Microbiol. Immunol.*, 180:167-182, 1991.
- Blanco J., Gonzáles E.A., Garcia S., Blanco M., Regueiro B. & Bernardez I. Production of toxins by *Escherichia coli* strain isolated from calves with diarrhea in Galicia (North-western Spain). *Vet. Microbiol.*, 18:297-311, 1988.
- Blanco M., Blanco J.E., Alonso M.P., Mora A., Balsalobre C., Munoa F., Juárez A. & Blanco J. Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: Relationship with expression of adhesins and production of toxins. *Res. Microbiol.*, 148:745-755, 1997.
- Blanco M., Blanco J., Gonzáles E.A., Gomes A.T., Zerbini L.F., Yano T. & Pestana A.F.C. Genes coding for Shiga-like toxins in bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) strains belonging to different O:K:H serotypes. *Vet. Microbiol.*, 42:105-110, 1994.
- Caprioli A., Falbo V., Ruggeri F.M., Baldassarri L., Bicchichia R., Ippolito G., Romoli E. & Donelli G. Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.*, 25:146-149, 1987.
- Contrepolis M., Bertin Y., Pohl P., Picard B. & Gireardeau J.P.A. Study of relationships among F17 a producing enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Escherichia 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. Microbiol.*, 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.*, 56:425-432, 2004.
- Gonzales E.A. & Blanco J. *Propiedades de los Escherichia coli causantes de diarrea en seres humanos: E. coli enterotoxigénicos (ETEC), enteropatógenos clásicos (EPEC) y enteroinvasivos (EIEC)*. Espanha, Servicio de Publicacións e Intercambio Científico, Universidade de Santiago de Compostela, 1987. 110 p.
- Hesham F.N., King-Lyons N.D., Hu J.C., Pasek R.C. & Connell T.D. LT-IIc, a new member of the type II heat-labile enterotoxin family encoded by an *Escherichia coli* strain obtained from a nonmammalian host. *Am. Soc. Microbiol.*, 78:4705-4713, 2010.
- Hirsh D.C. & Zee Y.C. *Microbiologia Veterinária*. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2003. 464p.
- Jackson M.P., Neil R.J., O'Brien A.D., Holmes R.K. & Newland J.W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. *Fems Microbiol. Letts*, 44:109-114, 1987.
- Johnson T.R. & Case C.L. *Laboratory Experiments in Microbiology*. 4<sup>th</sup> ed. Benjamin/Cumming Publishing Company, Redwood City, 1995. 422p.
- Leite D.S., Yano T. & Pestana de Castro A.F. 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.
- Leomil L., Aidar-Ugrinovich L., Guth B.E.C., Irino K., Vettorato M.P., Onuma D.L. & de Castro A.F.P. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. *Vet. Microbiol.*, 97:103-109, 2003.
- Menezes C.A., Gonçalves D.S., Amianti J., Fernandes I., Taddei C.R., Koga P.C.M., Trabulsi L.R., Martinez M.B. & Piazza R.M.F. Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. *Braz. J. Microbiol.*, 34:11-13, 2003.
- Nataro J.P. & Kaper J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Reviews*, 1:183-184, 1998.
- Oliveira S. J. *Microbiologia Veterinária*. 2<sup>a</sup> ed. Editora da Ulbra, Canoas, 2000.237p.
- Paton J.C. & Paton A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:450-479, 1998.
- Rigobelo 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.
- Roosendaal B., Gaastra W. & De Graaf F.K. The nucleotide sequence of the gene the K99 subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Fems Microbiol. Lett.*, 22:253-258, 1984.
- 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 fimbriae FY and 31A of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 31:417-426, 1987.
- Smith H.W. & Gyles C.L. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. *J. Microbiol.*, 3:387-401, 1970.
- Smith H.W. & Lingood M.A. Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains. *J. Med. Microbiol.*, 5:243-250, 1972.
- Trabulsi L.R. *Microbiologia*. 4<sup>a</sup> ed. Ateneu, São Paulo, 2004. 679p.
- Ugrinovich L.A., Ávila F.A., Oliveira M.A. & Pestana A.C.F. Identificação dos genes que codificam para a enterotoxina termolábil LT-II em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarréia na região de Jaboticabal, SP, Brasil. *Cienc. Rur.*, 32:289-291, 2002.
- Yano T., Tamashiro W.M.S.C., Garcia M. & Pestana A.C.F. Detecção de verotoxina (VT) em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerro com diarréia. *Rev. Microbiol.*, 17:339-341, 1986.