

CAPACIDADE DE ADESÃO E INVASÃO DE *ESHERICHIA COLI* OBTIDOS DE CABRAS COM DIFERENTES TIPOS DE MASTITE

Karenn da Silva Carvalho Gomes¹, Magna Coroa Lima, Sanelly Lourenço da Costa², Jéssica Lobo Albuquerque³, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira⁴

Resumo: A persistência de *Escherichia coli* (*E. coli*) no tecido está relacionada aos mecanismos de adesão e invasão desse patógeno à glândula mamária. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de *E. coli* isolados de cabras leiteiras com mastite clínica, subclínica e persistente na região da Zona da Mata de Minas Gerais, com principal foco na capacidade de invasão e adesão. Os determinantes bacterianos da invasão desse patógeno nas células epiteliais mamárias caprinas ainda não são claros, devido à indisponibilidade de cultivo celular contínuo de células epiteliais mamárias caprinas e a dificuldade de obter cultivo de células primárias, necessitando de padronização. Foi utilizado o cultivo de células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T) como modelo, devido às diferenças na produção do leite não podemos confirmar que *E. coli* se comporte da mesma forma em células mamárias caprinas. Diante disso, são necessários mais estudos na área para confirmar essa hipótese.

Palavras-chave: Mastite caprina, resistência, células mamárias, infecção, antimicrobianos.

Introdução

A mastite causada por *E. coli* pode ser esporádica e os sinais clínicos podem ser localizados ou resultarem em sintomas clínicos

¹ Graduanda em Medicina Veterinária –FAVIÇOSA/UNIVIÇOSA. E-mail: karennscgomes@gmail.com

² Docente da FAVIÇOSA/UNIVIÇOSA de Medicina Veterinária da UFV. E-mail: sanelylc@hotmail.com

³ Mestranda departamento de Medicina Veterinária da UFV. E-mail: jessicalobo_vet@hotmail.com

⁴ Docente do departamento de Medicina Veterinária da UFV. E-mail: masm@ufv.br

severos com episódios fatais. A prevalência da mastite causada por coliformes varia entre os diferentes países e sugerem que os isolados de *E. coli* obtidos de casos de mastite podem formar um novo patótipo - “mammary pathogenic *E. coli*” (MPEC) em virtude da semelhança entre as cepas obtidas de casos de mastite (Kaipainen et al., 2002).

É amplamente conhecido que a adesão dos microrganismos nas células do hospedeiro é o primeiro passo para colonização da superfície e estabelecimento de uma infecção (Finlay and Falkow, 1997). *E. coli* possui plasticidade genotípica que confere a esta bactéria uma fantástica e ampla gama de fatores de virulência que são essenciais para patogênese da mastite causada por este patógeno. A persistência do patógeno em um tecido geralmente envolve os mecanismos de adesão e invasão. A relação entre o tipo de mastite em cabras e as características dos microrganismos ainda não está clara.

Material e Métodos

Esse projeto foi aprovado na comissão de ética no uso de animais da UFV (CEUA/UFV) N° 42/2014. Para os ensaios de adesão e invasão foi utilizado a linhagem de células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T). As células MAC-T foram cultivadas em frascos de cultura de células T25 contendo Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, GibcoBRL, Grand Island, NY, EUA) a 37 °C com 5% de CO₂. O cultivo foi suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor sem antibiótico, até a confluência das células. Antes de cada experimento, as células MAC-T foram semeadas em placas de cultura de 12 poços e incubadas a 37 °C em CO₂ a 5% durante 24 horas, obtendo confluência de 90-95%.

As bactérias foram inoculadas em caldo BHI *overnight* e centrifugadas a 4500 G por 15 min, o *pellet* foi lavado com PBS diluídas em salina até a obtenção de uma suspensão bacteriana contendo, aproximadamente, 1×10^7 UFC/mL. A proporção de células para bactérias (MOI) de 10:1. O ensaio de adesão foi

segundo o protocolo descrito por Hensen e colaboradores (2000) com modificações. As monocamadas confluentes das células MAC-T ($\sim 1 \times 10^6$) cultivadas em placas de 12 poços foram infectadas com 1×10^7 UFC. Após 3 h de incubação a 37 °C com 5% de CO₂, as células foram lavadas (1 mL/poço) três vezes com PBS+ (PBS 0,01M, suplementado com 0,1 g/L de CaCl₂ e 0,2 g/L de MgCl₂) para retirar as bactérias não aderidas. Posteriormente, as células foram separadas pela adição de 1 mL de solução de tripsina + EDTA (0,1 % / 0,04 %) em cada poço. As placas foram incubadas numa atmosfera de 5 % de CO₂ ao ar a 37 °C durante 10 a 15 min. Após a incubação, as suspensões foram misturadas por pipetagem. Foi realizada a diluição seriada na base 10 das células separadas, e foram posteriormente plaqueadas na superfície do ágar BHI, incubadas a 37 °C por 24 h. A adesão foi expressa como o número total de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) recuperadas por poço. Cada ensaio foi executado em duplicata e repetido três vezes em dias diferentes. As células foram lavadas três vezes com PBS+ aquecido e desafiadas com *E. coli* (1×10^7 UFC/ml) e a placa incubada por 3 horas a 37 °C, em estufa com 5% de CO₂. Foram realizadas diluições seriadas dos lisados e plaqueados em superfície do ágar BHI, e as concentrações bacterianas foram determinadas a partir das contagens de colônia após incubação a 37 °C durante 24h. A invasão foi expressa como o número total de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) recuperadas por poço. Cada ensaio foi executado em duplicata e repetido três vezes em dias diferentes.

Resultados e Discussão

A concentração bacteriana (1×10^7) utilizada nos ensaios de adesão e invasão não apresentou citotoxicidade. Foi observado que *E. coli* obtidas de cabras com mastite persistente (após o tratamento) apresentaram maior poder de adesão e invasão que *E. coli* isolada do mesmo animal com mastite clínica (antes do tratamento) (Figura 1).

Döpfer e colaboradores (2000) estudando *E. coli* isoladas de

vacas com mastite clínica recorrente observaram que esses isolados possuem a capacidade de invadir as células epiteliais mamárias duas vezes maior e três vezes mais rápido que isolados de mastite clínica.

As observações sugerem que a mastite persistente seja uma consequência da infecção com cepas de *E. coli* que são capazes de invadir e sobreviver dentro de células epiteliais mamárias, evitando as defesas do hospedeiro, favorecendo assim a persistência da mastite (DÖPFER et al., 2000; HANSEN et al., 2000). Esses dados concordam com os encontrados no presente estudo, entretanto os determinantes bacterianos da invasão da *E. coli* nas células epiteliais mamárias caprinas ainda não são claros, devido a indisponibilidade de cultivo celular contínuo de células epiteliais mamárias caprinas e a dificuldade de obter cultivo de células primárias, necessitando de padronização. Foi utilizado cultivo de células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T) como modelo para espécie caprina, entretanto devido as diferenças na produção do leite não podemos confirmar que *E. coli* se comporte da mesma forma nas células mamárias caprinas. Por isso são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese.

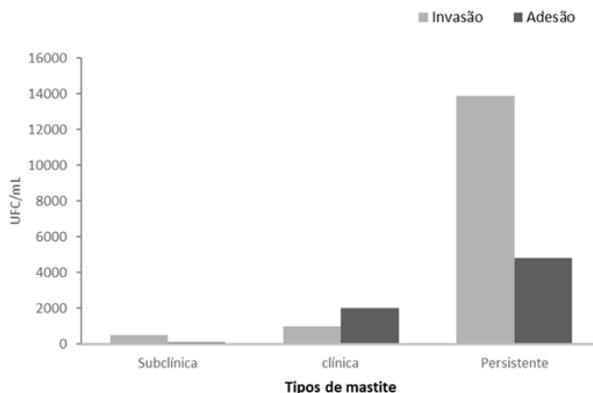


Figura 1. Ensaio de adesão e invasão em células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T) de *Escherichia coli* isoladas de cabras leiteiras com mastite clínica, persistente e subclínica.

Conclusões

Escherichia coli isolados de cabras com mastite persistente apresentaram maior capacidade de adesão e invasão que os isolados de mastite clínica e subclínica.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brazil).

Referências Bibliográficas

DÖPFER, D. et al., Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. **Vet. Microbiol.** 74, 331–343, 2000.

FINLAY, B.B., FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 61, 136–69, 1997.

HENSEN, S. M. et al Use of Bovine Primary Mammary Epithelial Cells for the Comparison of Adherence and Invasion Ability of *Staphylococcus aureus* Strains. **J. Dairy Sci.** 83, 418–429, 2000.

KAIPAINEN, T. et al Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. **Vet. Microbiol.** 85, 37–46, 2002.