



11ª Jornada Científica e Tecnológica do IFSULDEMINAS

& 8º Simpósio de Pós-Graduação

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA APEC (*ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA AVIÁRIA)

Maíra Ferreira França MARTINS¹; Maiara Ferreira França MARTINS¹; Gabriella R. de M. FLORES²; Rafaela F. D. BRUZADELLI²; Poliana Coste e COLPA³; Fabio Carvalho DIAS⁴

RESUMO

Colibacilose Aviária é uma doença causada pela bactéria APEC (*Escherichia coli* Patogênica Aviária), sendo considerada uma das principais doenças relacionadas a perdas econômicas na produção avícola e na condenação de carcaça em abatedouros, além de possuir um potencial zoonótico. Esta pesquisa teve como objetivo isolar a APEC por meio de sua caracterização em cultivos diferenciais e avaliar a caracterização bacteriana em provas bioquímicas de amostras de uma galinha com diagnóstico sugestivo de colibacilose. Na realização dos testes laboratoriais, foram utilizados diferentes tipos de amostras colhidas durante a realização da necropsia. O isolamento bacteriano foi verificado em todos os tipos de amostras colhidas, tanto nos meios de cultura diferenciais, como nos testes de caracterização bioquímica.

Palavras-chave:

Galinhas; Colibacilose; *Escherichia coli*; Diagnóstico laboratorial.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo e a colibacilose compromete a produção aviária por causar significativas perdas econômicas na indústria avícola (ABPA, 2018). A colibacilose aviária é uma doença causada pela bactéria *Escherichia coli*, caracterizada por um bacilo gram-negativo, fermentador de lactose, anaeróbio facultativo, não produtor de esporos, podendo ser móvel ou não (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

As cepas de *Escherichia coli* são classificadas em comensais, patogênicas intestinais e patogênicas não intestinais, sendo também divididas em subpatotipos. Nas aves, as amostras de APEC são responsáveis por causar uma doença sistêmica, com a infecção pelo trato respiratório e posterior evolução para a forma septicêmica (BORZI, 2019; REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

A suspeita de colibacilose nas aves é feita pelos achados clínicos e lesões macroscópicas típicas. As técnicas disponíveis para o diagnóstico laboratorial consistem no isolamento bacteriano

¹ Discentes do curso de Medicina Veterinária, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: maira.franca@hotmail.com.

² Discentes do curso de Ciências Biológicas, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho.

³ Responsável Técnica do Laboratório de Bromatologia e Água, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: poliana.colpa@muz.ifsuldeminas.edu.br.

⁴ Orientador e docente do curso de Medicina Veterinária, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: fabio.dias@muz.ifsuldeminas.edu.br.

em meios de cultura, nas provas bioquímicas, nos testes sorológicos e nos testes moleculares, sendo estes dois últimos considerados confirmatórios. Entretanto, o diagnóstico presuntivo pode ser obtido pela cultura e isolamento do agente a partir de amostras de tecidos acometidos (NOLAN et al., 2013).

Podem ser utilizados meios de cultura seletivos como o McConkey e EMB (*Eosin Methylene Blue*), com a posterior verificação das características morfológicas das colônias (FILHO, 2007; KABIR, 2010). As reações bioquímicas como a produção de indol, a reação vermelho de metila positivo, a fermentação da glicose com a produção de gás, a presença de β -galactosidases, a ausência de produção de sulfito e de uréase, bem como a incapacidade de usar citrito como fonte de carbono, podem ser utilizados para auxiliar na identificação do isolado bacteriano (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999; NOLAN et al., 2013; REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

O estudo teve como objetivo isolar a APEC por meio de sua caracterização em meios de cultivo diferenciais, bem como avaliar a caracterização bacteriana em provas bioquímicas, a partir de amostras colhidas de uma galinha com o diagnóstico sugestivo de colibacilose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização da pesquisa, foram colhidas amostras de uma galinha de postura para o diagnóstico etiológico durante a realização da necropsia, cujo óbito ocorreu na mesma data. Esta pesquisa está inserida no projeto aprovado pelo CEUA sob o número 017/2019.

Foram colhidas cinco diferentes tipos de amostras: fragmento do granuloma (1), líquido ascítico da cavidade celomática (2), conteúdo líquido do oviduto (3), formação caseosa do oviduto (4) e fragmento do pâncreas (5). As amostras foram inoculadas em tubos contendo o caldo de enriquecimento BHI (*Brain Heart Infusion*) e em seguida mantidas em estufa a 37°C por 24 horas.

Após este período, foi realizada a semeadura de alíquotas de cada amostra, mantida em caldo de enriquecimento BHI, em meios de cultura PCA (*Plate Count Agar*), tanto em placas de Petri quanto em tubos contendo meio de cultura inclinado, para a realização do isolamento bacteriano, das provas bioquímicas (indol e vermelho de metila), da coloração diferencial (Coloração de Gram) e da prova de catalase. Também foram utilizadas alíquotas das amostras enriquecidas no Caldo BHI para a semeadura em Caldo Lauril, com o objetivo de verificação da presença de fermentação da lactose e para a semeadura nos meios de cultura diferenciais (EMB, McConkey e Verde Brilhante).

Depois de 24 horas de incubação a 37°C, a morfologia e a coloração das colônias isoladas foram avaliadas conforme a descrição na literatura. Para a realização do teste de vermelho de metila, foram adicionados 5 gotas do corante vermelho de metila em 2,5 mL da cultura enriquecida

no Caldo BHI. Para a prova do indol, foram adicionados 5 gotas do reagente de Kovacs no tubo com as culturas em meio inclinado após 24h de incubação. A prova de fermentação da lactose foi utilizada por meio da inoculação de 0,1 mL da amostra enriquecida no Caldo BHI ao Caldo Lauril.

Na prova de catalase, foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio nas colônias isoladas na placa de Petri contendo o meio de cultura PCA. A coloração de Gram foi realizada a partir de colônias isoladas no meio de cultura PCA e nos meios de cultura diferenciais, de acordo com a respectiva metodologia.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para o isolamento bacteriano, devem ser realizadas culturas de tecidos de órgãos acometidos como o fígado, baço, sacos aéreos, oviduto e exsudato na cavidade celomática (FERREIRA, 2009; FILHO, 2007). No presente trabalho, foram colhidas amostras de conteúdo líquido ascítico da cavidade celomática, fragmento do granuloma, formação caseosa do oviduto, conteúdo líquido do oviduto e fragmento do pâncreas.

Em caldos de enriquecimento, a alteração da turbidez indica o crescimento de microrganismos. A *E. coli* promove turbidez rapidamente quando adicionadas em caldos de enriquecimento. Assim como verificado por Nolan et al. (2013), o caldo de enriquecimento utilizado foi o BHI e este apresentou turbidez em 24 horas após a inoculação das amostras.

Na pesquisa de Dho-Moulin e Fairbrother (1999), não somente foram utilizados os meios diferenciais McConkey e o EMB, como também o meio Verde Brilhante, para o isolamento de *Escherichia coli*. Segundo Gomis et al. (1997), é possível haver crescimento da cultura entre 6 horas e 3 dias em casos agudos e, como descrito por esses autores, foi possível verificar o crescimento de colônias características a partir de 24 horas após a semeadura.

Houve o isolamento bacteriano em todos os meios de cultura diferenciais utilizados para os diferentes tipos de amostras e as colônias apresentaram características em conformidade com aquelas descritas pela literatura: colônias róseas no meio McConkey, verde metálicas no meio EMB e amareladas no meio Verde Brilhante (NOLAN et al., 2013).

A prova de indol apresentou resultado positivo com a formação de um anel avermelhado na superfície do meio inclinado, característica de bactéria gram-negativa fermentadora como a *Escherichia coli*. A prova de vermelho de metila também teve um resultado positivo, obtendo uma coloração vermelha, demonstrando assim a produção de ácidos na fermentação da glicose, conforme descrito por Frigatto, Fernandes e Vaz (2008).

Verificou-se a produção de gás nas amostras inoculadas no Caldo Lauril após 24 horas de incubação, características de bactérias que fermentam rapidamente a lactose, como a *Escherichia*

coli. Pelo teste de Gram, verificaram-se colônias de bacilos gram-negativos. Na prova de catalase, houve a liberação de bolhas de gás devido a produção da enzima catalase, que também é uma característica da *Escherichia coli*. O mesmo foi observado por Filho (2007) e Nolan et al. (2013).

Na atualidade, ainda não há estudos suficientes para definir a APEC. Além disso, a variedade de sorotipos e subtipos é extensa, o que dificulta encontrar ferramentas diagnósticas confirmatórias, pois devido à ampla variedade de cepas bacterianas, pode haver inúmeras associações de fatores de virulência e diversas dessas associações podem induzir a enfermidade (SCHOULER et al., 2012).

4. CONCLUSÕES

Todos os testes laboratoriais realizados, tanto para o isolamento da bactéria, quanto os testes bioquímicos, associados ao diagnóstico clínico e ao diagnóstico anatomopatológico, indicam a detecção da APEC como o agente etiológico do caso em questão. No entanto, para o diagnóstico conclusivo, seria necessária a realização de testes sorológicos ou testes moleculares.

REFERÊNCIAS

ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal). **Relatório Anual**, 2018.

BORZI, M. M. **Caracterização de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) isoladas de galinhas de angola (*Numida meleagris*)**. 2019. 53 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista–Unesp, Jaboticabal, 2019.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**. v. 30, p. 299-316, 1999.

FILHO, A. R. L. **Saúde Aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2007.

GOMIS, S. M. et al. Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 41, p. 234-40, 1997.

KABIR, S. M. L.. Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 7, n. 1, p.89-114, jan, 2010.

NOLAN, L. K. et al. Colibacillosis. In: SWAYEN, D. E. et al. **Diseases of Poultry**. 13. ed. Wiley-blackwell, 2013. p. 751-805.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009.

SCHOULER, C. et al. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. **Journal of Clinical Microbiology** v. 50, p. 1673-1678, 2012.

WON, G. et al. Profiles of virulence-associated of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates from chickens with colibacillosis. **Poultry Science**. v. 46, p. 260- 266, 2009.