

COMPARAÇÃO ENTRE COLETAS DE AMOSTRAS FECAIS PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM CAMUNDONGOS ORALMENTE TOLERIZADOS*

Camilla da Paixão Duarte¹⁺ e Maria de Fátima Sarro da Silva²

ABSTRACT. Duarte C. da P., & da Silva M. de F.S. [Comparison between collections of fecal samples for microbiological analysis in orally mice immunized]. Comparação entre coletas de amostras fecais para análise microbiológica em camundongos oralmente tolerizados. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 34(3):165-168, 2012. Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21944-970, Brasil. E-mail: camillabiotec@hotmail.com

The microbiological analysis of fecal material can be determined from direct and indirect collection and subsequent testing classical biochemical identification of bacterial being his perfect characterization directly related to how to collect, taking into account the physiological characteristics of bacterial species to be investigated. The aim of this study was to compare the sensitivity of two protocols for the collection of fecal samples for characterization of Enterobacteriaceae isolates in two structures of the enteric tract of a genetically engineered animal model for studies of oral tolerance. As to results obtained by the protocols drawn here, they do not show significant differences in the qualitative and quantitative aspects of the isolates.

KEY WORDS. Enteric microbiota, enterobacteric, bacterial ecology, oral tolerance, mice.

RESUMO. A análise microbiológica de material fecal pode ser determinada a partir de coletas diretas e indiretas e posterior realização de ensaios bioquímicos clássicos de identificação bacteriana, estando sua perfeita caracterização diretamente relacionada com a forma de coletar levando-se em consideração as características fisiológicas das espécies bacterianas a serem investigadas. O objetivo deste trabalho foi comparar a sensibilidade de dois protocolos de coletas de amostras fecais, para caracterização de amostras de *Enterobacteriaceae*, em duas estruturas do trato entérico de um modelo animal desenvolvido geneticamente para estudos de tolerância oral. Os resultados obtidos pelos protocolos aqui desenhados não mostraram diferenças significativas, quanto aos aspectos qualitativos e quantitativos dos isolados.

PALAVRAS-CHAVE. Microbiota entérica, enterobacterias, ecologia bacteriana, tolerância oral, camundongos.

INTRODUÇÃO

A resposta fisiológica a antígenos alimentares e aos antígenos da microbiota entérica é a indução de um estado específico de baixa reatividade sistêmica, conhecida como Tolerância Oral, sendo seu papel preponderante impedir o desenvolvimento de hipersensibilidade alimentar e contra a microbiota endógena evitando o desenvolvimento de processos inflamatórios intestinais (Baumgart & Carding 2007).

Pela importância fisiológica e imunológica da tolerância oral, duas linhagens de camundongos foram obtidas, por seleção genética bidirecional, para fenótipos extremos de Tolerância Oral - Resisten-

*Recebido em 8 de junho de 2011

Aceito em 28 de junho de 2012

¹ Biotecnóloga, Universidade Estadual da Zona Oeste, Avenida Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, RJ 23070-200, Brasil.

⁺ Autor para correspondência E-mail: camillabiotec@hotmail.com

² Bióloga, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21944-970, Brasil. E-mail: mf.sarrosilva@gmail.com

te (Linhagem TR-Ab/HetS) e Sensível à tolerância (Linhagem TS-Ab/HetS) - por tratamento intragástrico com ovalbumina (OVA) solúvel, previamente à imunização sistêmica com o mesmo antígeno (da Silva et al. 1998). Como consequência das modificações ocasionadas por esta seleção genética, efeitos divergentes podem ser gerados nas várias infecções experimentais, parasitárias extracelulares e intracelulares, como também no padrão de distribuição da microbiota entérica nesse modelo animal (da Silva et al. 2001, Machado et al. 2005, Tavares et al. 2006).

Devido à diferença de concentração e colonização nos diversos segmentos do trato entérico, a representatividade dos gêneros bacterianos da microbiota entérica pode estar relacionada com os métodos de coleta empregados para análise desse material. Tendo em vista a estreita relação entre microbiota entérica e o hospedeiro, o presente trabalho teve como objetivo comparar dois protocolos de coleta de amostras fecais (método direto e indireto) no modelo animal desenhado para estudos de Tolerância Oral, quanto a sua sensibilidade, através da caracterização fenotípica das amostras bacterianas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Para o desenvolvimento deste trabalho foi avaliado um total de oito camundongos (n=8). Os animais foram gentilmente cedidos pelo Dr. Antonio Carlos da Silva, professor titular do Departamento de Genética do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os protocolos adotados foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais (CEA-IBRAG-UERJ), instituído pela portaria 09/2000.

Protocolo 1. Cultivo Direto

As fezes foram coletadas através de *swabs*, contendo meio de transporte Cary Blair (Difco). Foram semeadas em um intervalo máximo de uma hora a partir da coleta. As amostras foram semeadas diretamente em placas contendo meios de cultura específicos. Todas as amostras foram semeadas em duplicatas.

Protocolo 2. Cultivo Indireto

Neste protocolo, os mesmos animais utilizados no cultivo direto foram submetidos à eutanásia, por deslocamento cervical e necropsiados em ambien-

te estéril. Da região do ceco coletou-se um volume aproximado de 10 µg de material fecal e imediatamente inoculou-se em caldo BHI e Caldo Lactosado, com um volume de 3 ml por tubo (preparados conforme as instruções do fabricante) e incubados overnight a 37°C. Todas as amostras foram semeadas em duplicatas.

Isolamento e Caracterização Bioquímica das Amostras

As amostras provenientes dos *swabs* (método direto) foram semeadas em meios ágar de Cistina Lactose Deficiente de Eletrólitos (CLED) e ágar MacConkey de baixa e média seletividade respectivamente. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. As amostras do cultivo indireto, a partir do crescimento em caldo BHI e caldo Lactosado, foram igualmente semeadas em ágar CLED e ágar MacConkey e incubadas nas mesmas condições antes citadas. Colônias sugestivas de enterobactérias foram isoladas dos meios seletivos e repicadas em meio Triplo Açúcar Ferro (TSI-Difco) preparado segundo o fabricante, para observação das seguintes reações: fermentação da glicose, lactose e/ou sacarose, bem como a produção de gás sulfídrico. A partir dos padrões de fermentação apresentados em meio de triagem TSI, as amostras seguiram para caracterização bioquímica, a nível de gênero/espécie, sendo submetidas às seguintes provas bioquímicas: provas da citocromo-oxidase, fermentação da glicose e carboidratos correlatos; provas reativas para produção de vermelho de metila e de acetoina, descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina, dehidrolação da arginina, de indol, verificação da motilidade, produção de H₂S, desaminação da fenilalanina, produção de esculina descarboxilação do citrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo para caracterização da microbiota tem como principal finalidade traçar um perfil de colonização e checar possíveis alterações nos espécimes residentes, a fim de evitar erros e interferência na experimentação, como também monitorar para possíveis enteropatógenos que possam comprometer a saúde animal e se disseminar pelo plantel e nas dependências de um biotério.

Neste trabalho foram identificadas 80 cepas onde 68 (85%), apresentavam o mesmo padrão bioquímico característico das *Enterobacteriaceae*, sendo 29 (42.6%) recuperadas do cultivo direto e 39 (57.3%)

do cultivo indireto e 12 amostras (15%) com padrão não fermentador (Tabela 1).

Comparando-se somente os isolados de Enterobacterias, podemos observar uma maior prevalência do gênero *Proteus* spp., sendo 20 (68.9%) cepas recuperadas por cultivo direto e 16 (41%) recuperadas das amostras oriundas do ceco. Em uma primeira análise foi possível perceber que, sob o aspecto qualitativo, não houve diferença significativa quanto ao isolamento de cepas sugestivas e posteriormente confirmadas como família *Enterobacteriaceae*. Quanto ao aspecto quantitativo, o cultivo indireto se mostrou um pouco mais eficiente (57,3%), no que diz respeito à recuperação de determinadas espécies que, em nosso resultado, justificam-se pelo número de cepas confirmadas como pertencente ao gênero *Proteus* spp. Essa diferença ainda que pequena pode estar relacionada com a etapa de enriquecimento onde os meios utilizados favorecem células injuriadas presentes no material analisado, tornando-as viáveis.

Encontra-se bem estabelecido na literatura que, para análise de amostras de fezes humanas, visando o isolamento de Enteropatógenos clássicos, como *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. a utilização de protocolos de cultivo indireto (enriquecimento) mostra-se necessário para a correta identificação de possíveis agentes etiológicos implicados em surtos entéricos, em detrimento das espécies endógenas (Costa & Hofer 1972). Entretanto, para estudos da caracterização da microbiota entérica por metodologia clássica os protocolos adotados neste ensaio não mostraram diferenças significativas.

Algumas variáveis podem influenciar nos estudos de coleta de microbiota intestinal de qualquer espécie animal, como as variações ambientais, variações nas técnicas de coleta, carga bacteriana coletada, fatores metabólicos do microrganismo, coletas em fase de morte celular do microrganismo, variações no perfil da microbiota com a prevalência

Tabela 1. Identificação de Entobacteriáceas da microbiota intestinal de camundongos.

Cepas isoladas	Cultivo direto		Cultivo indireto		Total
	Linhagens		Linhagens		
	TR-Ab/ HetS	TS-Ab/ HetS	TS-Ab/ HetS	TR-Ab/ HetS	
<i>Escherichia coli</i>	4	-	4	5	13
<i>Enterobacter</i> spp.	5	-	12	2	19
<i>Proteus mirabilis</i>	-	20		16	36
Não fermentador	6	2	4	-	12
TOTAL	15	22	20	23	80

natural de algumas estirpes bacterianas, em detrimento de outras, levando em consideração as exigências nutricionais de cada microrganismo (Blaut 2007). Outro fator a considerar com relação à metodologia de coletas de um material biológico é a que se destina esse material. A busca por determinados patógenos em detrimento de outros pode levar a escolha de um ou outro método.

A utilização de *swabs* secos em meio de transporte mostra-se amplamente difundida nos laboratórios de análise microbiológica, tendo como principal vantagem, a facilidade para coletar o material e a praticidade no transporte até as dependências do laboratório onde o material será processado. Outra questão que deve ser considerado é o microambiente de onde provem o material a ser analisado. A disponibilidade de animais de laboratório por si só não traduz a importância que representam nos resultados dos experimentos em que estão envolvidos. Logo, os animais produzidos com a finalidade de serem utilizados em pesquisa, devem possuir características genéticas e sanitárias adequadas à experimentação (Pinto et al. 2002).

O trato entérico animal pode ser considerado um reservatório de espécies comensais que, em determinadas condições, podem desencadear processos infecciosos. Favoretto et al. (2009) ao analisar a microbiota entérica de *Rattus norvegicus* oferecido como alimentação de animais mantidos em zoológicos, ressalta a importância do conhecimento do padrão microbiológico entérico, haja vista o grande potencial de transmissão de patógenos zoonóticos para os animais mantidos em cativeiro. O mesmo autor, em seus resultados, relata o isolamento de cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., em percentual relativamente homogêneo para essas espécies, mas não relata nenhum isolamento de amostras de *Proteus* spp., o que parece ser um resultado discordante frente aos resultados obtidos neste experimento.

Em estudo desenvolvido por Minagawa (2007) de caracterização de cepas enteropatogênicas de *Escherichia coli*, em varias linhagens de camundongos do biotério da Universidade de São Paulo, entre eles Swiss, Balb/C; C57BL/6 e Ycx43, apenas nesta ultima o referido autor teve um isolamento significativo de cepas de *Proteus* spp. É necessário, portanto, constante supervisão para aplicação correta das técnicas de manejo zootécnico, garantindo a condição sanitária e o monitoramento das condições ambientais recomendadas para a espécie

animal, propiciando bem-estar de forma a não interferir no equilíbrio fisiológico, biológico e comportamental, que possam invalidar a experimentação em curso. Em nosso experimento, a utilização deste modelo animal previamente selecionado geneticamente, mostra uma clara prevalência de uma espécie bacteriana (*Proteus mirabilis*) em relação às que normalmente predominam, como a *E. coli*. Sabe-se que o mecanismo de adesão e interferência bacteriana ainda não está bem esclarecido na literatura.

Os estudos sinalizam para o envolvimento de competição por receptores ou sítios de ligação nas células do hospedeiro, a competição por nutrientes, a inibição mútua por produtos metabólicos ou tóxicos, a inibição mútua por substâncias antibióticas ou bacteriocinas ou outros mecanismos que possam estar envolvidos na localização e manutenção da célula bacteriana na superfície da mucosa entérica, que precisam ser melhor elucidados. Partindo da premissa que a seleção bidirecional aos quais os camundongos adotados no referido estudo foram submetidos, esta prevalência/incidência de amostras de *Proteus* spp., em detrimento das demais, pode, de alguma maneira, estar refletindo também a seleção de sítios de adesão presente nos enterócitos desses animais.

CONCLUSÃO

Atualmente, as pesquisas em animais têm como propósito a geração de conhecimento que seja transponível aos seres humanos, em caso das pesquisas nas fases pré-clínicas ou básicas, ou, ainda, a pesquisa como fim, na qual é estudado o animal e suas características. No transcórre deste trabalho foi possível verificar que os protocolos previamente descritos mostraram eficácia na recuperação de cepas de enterobactérias de forma bastante homogênea, sinalizando para estudos posteriores que visem à caracterização dos variados gêneros bacterianos presentes no trato entérico desse modelo animal, a utilização de *swabs* pode ser desenvolvida sem a

necessidade da eutanásia dos animais em questão, permitindo, portanto, a realização de experiências futuras em diferentes tempos com os mesmos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baumgart D.C. & Carding S.R. Inflammatory bowel disease: cause and Immunobiology. *Lancet*, 369:1627-1640. 2007.
- Blaut M. & Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J. Nutri.*, 137(supl. 2):751S-755S. 2007.
- da Silva A.C., Lopes L.M., Tavares D.A., Araújo L.M.M. & Ribeiro O. Effect of genetic modifications by selection for immunological tolerance on fungus infection in mice. *Microb. Infect.*, 3:1-8. 2001.
- da Silva A.C., Souza K.W., Machado R.C., Da Silva M.F.S. & Sant'Anna A.O. Genetics of immunological tolerance: I. Bidirectional selective breeding of mice for oral tolerance. *Res. Immunol.*, 149:151-61. 1998.
- Favorreto S.M., Chagas C.R.F., Gonzalez I.H., Mylashiro S. & Nassar A.F.C. *Microbiota Entérica de Rattus norvegicus do Biotério da Fundação Parque Zoológico de São Paulo*. 2009. (Disponível em: <www.spzoo.org.br/anais2010/microbiota_rattus.pdf>).
- Costa G.A. & Hofer E. *Isolamento e identificação de Enterobactérias*. Monografia, Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1972.120p.
- Machado-Silva J.R., Neves R.H., da Silva L.O., de Oliveira R.M., da Silva A.C. Do mice genetically selected for resistance to oral tolerance provide selective advantage for *Schistosoma mansoni* infection? *Exp. Parasitol.*, 111:1-7. 2005.
- Minagawa C.Y. *Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, de estirpes de E. Coli e do meio ambiente em biotérios*. Dissertação de Mestrado (Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2007. 108f. (Disponível em: <http://www.teses.usp.br/%20teses/disponiveis/.../Clarice_Yukari_Minagawa.%20pdf>).
- Pinto R.M., Gomes D.C., Muniz-Pereira L.C. & Noronha D. Helminths of the guinea pig, *Cavia porcellus* (Linnaeus), in Brazil. *Rev. Bras. Zool.*, 19 (Supl. 1):261-269, 2002.
- Tavares D.A., Ribeiro R.C. & Da Silva A.C. Inflammatory lesion and parasite load are inversely associated in *Leishmania amazonensis* infected mice genetically selected according to oral tolerance susceptibility. *Microb. Infect.*, 8:957-964, 2006.