



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PARA IDENTIFICAÇÃO E DETECÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA FIMBRIAIS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ÁGUA UTILIZADA PARA DESSEDENTAÇÃO DE GADO BOVINO

Bruna de Jesus Mamona¹; Claudio Roberto Nobrega Amorim²

1. Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: bjmamona@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: amorim@uefs.com

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli*; virulência; água.

INTRODUÇÃO

A água é uma substância de vital importância para a sobrevivência da maior parte dos organismos vivos. Essa água, quando destinada ao consumo humano e animal, deve estar livre de substâncias ou organismos patogênicos. Sendo utilizada na dessedentação animal, pode ser veículo de agentes biológicos causadores de doenças animais (SOUZA *et al.* 1983). A colibacilose é uma dessas patogenias que acomete animais neonatos, causada pela *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC).

A fim de minimizar ou extinguir riscos à saúde humana e animal, a resolução normativa nº 357 do CONAMA (BRASIL, 2005) estabelece parâmetros de qualidade a serem atendidos. Dessa forma, alguns microrganismos são utilizados como indicadores de contaminação, seja na análise microbiológica de alimentos como também da água. A utilização dos coliformes totais e termotolerantes como indicadores de contaminação, nos revela a ocorrência de condições sanitárias impróprias, contaminação fecal ou presença de patógenos (COSTA *et al.* 2013; SOUZA *et al.* 1983). Os Coliformes são membros da família Enterobacteriaceae que inclui o gênero *Escherichia* e outros. A identificação de contaminação fecal é feita através da identificação da *E. coli*, principal representante do grupo dos coliformes termotolerantes, que tem habitat exclusivo no trato intestinal de animais de sangue quente (SOUZA *et al.* 1983).

A ETEC comumente causadora de diarreia em bezerros neonatos tem como característica a produção de fatores de aderência chamados de fímbrias, que são importantes para colonização e aderência da bactéria ao tecido hospedeiro, e a produção de duas enterotoxinas: a termolábil (LT) e a termoestável (ST). As fímbrias normalmente associadas a quadros diarreicos nestes animais são a F5, F17 e F41.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas três coletas, com intervalo aproximado de 60 dias, sendo coletados cerca de 100 mL de água de sete pontos diferentes em uma fazenda no município de São Gonçalo dos Campos - Bahia. A partir das amostras obtidas dos

bebedouros foi realizada técnica do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes segundo descrito pelo Manual Prático de análise de água, disponibilizado pela FUNASA em 2009.

As amostras positivas para coliformes termotolerantes no NMP seguiram para isolamento e identificação de *Escherichia coli*. Estas foram semeadas por esgotamento no Agar Eosina-Azul de Metileno e incubadas a 37°C durante 24h. Após o período de incubação, cerca de cinco colônias isoladas suspeitas de serem *E. coli* foram inoculadas em meio BHI a 37°C durante 24 horas. As amostras crescidas em BHI seguiram para os demais testes de identificação. Foram eles: fermentação de lactose, descarboxilação de lisina, produção de urease, testes Vermelho Metila e Voges-Proskauer. Além desses, foram feitos testes para verificar a produção de indol e a utilização de citrato como fonte de carbono (Koneman, 2001).

Do total de colônias isoladas e identificadas de *E. coli* foram selecionadas 60 amostras para a detecção de fímbrias manose-resistentes e produção de hemólise. Para a detecção de fímbrias manose-resistentes foi realizado o teste de microhemaglutinação manose-resistente (MHMR), sendo coletados eritrócitos de humano, boi, cavalo e carneiro utilizando solução anticoagulante e, posteriormente, preservados a 4°C. As hemácias foram lavadas por quatro vezes com tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, contendo 1% de manose (PBS-M) até a formação de sobrenadante transparente e utilizadas na concentração de 1%. Para a realização do teste MHMR, foram utilizadas microplacas com 96 poços e base em U. As amostras de *E. coli* foram cultivadas em placas de Petri contendo meio Minca (Guiné et al. 1977) a 37°C por 24 horas. A suspensão bacteriana foi, então, diluída em PBS-M na razão de 1:2 até 1:16. Posteriormente, foram adicionados 50µL de suspensão de eritrócitos a 1%. As placas foram incubadas por 2 horas, à 4°C. Após este intervalo de tempo, se procedeu a leitura.

Para o teste de produção de hemólise a bactéria foi cultivada em placas contendo meio ágar-sangue, a uma concentração de 5% de sangue de carneiro e postas em estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas para crescimento (Ribeiro et al, 2006).

Com relação à identificação genética das fímbrias foi necessária a extração do DNA bacteriano. Duas metodologias foram testadas, sendo a primeira elaborada tendo como base o modelo proposto por Blanco et al. (1997), que consiste em um método de fervura, e a segunda utilizando-se reagentes específicos PureLink® Genomic DNA Mini Kit seguindo a metodologia proposta pela própria marca.

O método de fervura consistiu em cultivar as amostras em meio BHI, por um período de 24h a uma temperatura de 37°C e em seguida semeadas em caldo BHI, por 24h a 37°C. Cerca de 1 mL da amostra da cultura foi coletada e centrifugada a 10000 rpm por 30 segundos, com o sobrenadante sendo descartado posteriormente. O pellet foi ressuspenso em 1 ml de água destilada e centrifugado a 10000 rpm por 30 segundos, com o sobrenadante sendo descartado novamente. O pellet foi novamente ressuspenso em 800µL de água destilada e fervido a 100°C por 10 minutos. Após a fervura, o material foi centrifugado a 11000 rpm por 2 minutos, cerca de 500µL foram transferidos para outro tubo de ensaio para posterior utilização na PCR.

Para o método de extração por reagentes específicos PureLink® Genomic DNA Mini Kit a concentração de DNA foi quantificada tendo como base de comparação um padrão de DNA com concentração conhecida (25ng/µL). Foi montado gel de agarose a 1% para a realização de eletroforese, de modo que houvesse um poço com 2µL de gel red e 2µL de padrão de DNA (25ng/µL), outro poço com 2µL de gel red e 4µL de padrão de DNA e os demais poços com 2µL de DNA extraído das amostras analisadas, 3µL de corante, 5µL de água ultra pura e 2µL de gel red. Dessa forma a concentração de DNA extraído pôde ser medida a partir da comparação com banda gerada pelo padrão de DNA com concentração de 50ng/µL e outro com concentração de 100ng/µL. A

concentração do DNA extraído foi padronizado para que em um volume de 100µL houvesse 10ng de DNA.

A bioquímica definida para PCR consistiu nos valores de 2µL de tampão (10x), 0,8µL de MgCl₂ (50mM), 1,6µL de dNTP, 2µL de primer 1 (2pMol), 2µL de primer 2 (2pMol), 0,5µL de Taq DNA polimerase (1U), 1µL de DNA (10ng/µL) e água ultra pura para completar uma solução total de 20µL.

O programa para o termociclador foi ajustado para um estágio inicial de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturação por 30 segundos com a temperatura ideal para cada primer e extensão a 72°C por 5 minutos. Por fim, as análises dos produtos do PCR e a quantificação do DNA foram feitas por eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE 1% (Tris-Acetato-EDTA) a 100 volts por 50 minutos. A identificação das bandas foi feita a partir da utilização de corante específico e posterior observação em luz UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da Técnica do Número Mais Provável obteve-se que todos os pontos amostrados durante todas as três coletas, estão de acordo com a recomendação do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) em sua resolução N°357/2015, a qual preconiza que não se exceda o limite de 1000 coliformes termotolerantes a cada 100mL de água para dessedentação animal em 80% das amostras.

Das amostras positivas para coliformes termotolerantes da etapa confirmativa do NMP foram isoladas e identificadas um total de 436 colônias de *Escherichia coli*. Dessas, 60 colônias foram escolhidas de forma aleatória e testadas para a presença de fímbrias manose-resistente.

Das 60 colônias analisadas no teste MHMR, apenas 13 (21,7%) apresentaram resultado positivo para pelo menos um tipo de eritrócito. Somente 5% das amostras de *E. coli* aglutinaram mais de um tipo de hemácia. O título dos resultados positivos para as amostras variou de 1/2 a 1/16, com somente uma amostra hemaglutinando até a titulação máxima. Em contrapartida, 47 amostras apresentaram resultados negativos com todos os tipos de eritrócitos.

Pelo fato de testes com sangue de ovino terem maior probabilidade de apresentar resultados falso-positivos, é mais seguro supor que as amostras que, possivelmente, apresentam fímbrias manose-resistente (MR) são aquelas que aglutinaram com mais de um eritrócito ou que aglutinaram somente com um eritrócito que não seja de ovino. Portanto, as amostras 1(3)1, 2(4)1, 8(2)1, 9(1)1, 24(2)1, 36(2)1, 37(3)1, 19(4)2, 22(1)2, 29(1)2, 7(1)3, 24(4)3 e 25(3)3 possivelmente apresentam algum tipo de fímbria MR.

Dentre as 60 amostras testadas para produção de hemolisina, somente uma apresentou halo de hemólise, sendo, portanto, as demais amostras negativas.

A quantificação do DNA por meio da eletroforese demonstrou que o método de extração do Mini Kit obteve concentrações abaixo de 50ng/µL tanto na primeira quanto na segunda eluição para todas as amostras padrões.

A primeira PCR que foi realizada tinha como objetivo testar a capacidade de amplificação do DNA da amostra padrão (cepa isolada de *E. coli* que contém região genômica que expresse a característica alvo) para a fímbria F5 e a eficiência do primer específico utilizado. O resultado da PCR demonstrou que o DNA da amostra padrão extraído com o Mini Kit da PureLink[®] estava apto para a realização de PCR tendo em vista que houve amplificação do gene V₄V₅ expressada pela formação de banda bem delimitada e acentuada, assim como a confirmação da eficiência do primer específico para fímbria F5 que foi capaz de amplificar o gene do DNA padrão responsável pela decodificação deste fator de virulência

A segunda e última PCR realizada teve como finalidade definir qual método de extração de DNA apresentaria melhor custo/benefício. Como resultado foi obtido que o DNA da amostra padrão F17 extraído tanto por fervura como através do kit apresentaram bandas de amplificação, evidenciando a eficiência do primer como também a viabilidade do DNA de ambas as extrações. Já para o DNA da amostra padrão F41 houve somente amplificação do DNA extraído através do Kit, o que demonstra a eficácia do primer F41 em amplificar o gene alvo e que neste caso houve alguma falha durante o processo de extração por fervura.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que os pontos de coleta de água estavam viáveis para a utilização pelo gado bovino no período em que se deu a pesquisa. Entretanto, há a probabilidade da presença de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) devido à detecção da possível presença de fímbria manose-resistente em algumas amostras de colônias isoladas e a existência de possível risco por conta da identificação de uma colônia produtora de hemolisina. Por fim, diante desses resultados podemos determinar que os primers são capazes de amplificar seus genes alvos específicos e inferir que o método de extração através do Mini Kit da PureLink® apresenta maior confiabilidade para a obtenção de DNA com maior qualidade. No entanto, o método de fervura também pode ser capaz de ser utilizado com segurança.

REFERÊNCIAS

BLANCO, M.; et al.; 1997. 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(9): 745-755.

Conselho Nacional do Meio Ambiente [CONAMA]. 2005. Resolução CONAMA nº 357, de 17 março de 2005. Disponível na World Wide Web em: <http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf> [08 ago. 2020]

COSTA *et al.* 2013. Análise físico-química e microbiológica da água de tanques utilizados na dessedentação de bovinos. Revista de Ciências Exatas e da Terra UNIGRAN, v2, n.2, p43-55.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. 2009. Manual prático de análise de água. 3ª ed. rev. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde.

GUINÉE, P. A. M et al. 1977. Improved Mincamédium for detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 15: 676-678.

KONEMAN, E.W. et al. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p.1465.

SOUSA *et al.* 1983. Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em águas usadas na dessedentação de animais. Rev. Sau. Publica. 17:112- 22. São Paulo.