



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

DETECÇÃO MOLECULAR DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* COLETADAS DE BEZERROS COM DIARREIA NO RECÔNCAVO BAIANO

Gabrielle Casaes Santana¹; Rogério Mercês Ferreira Santos²; Bruna de Jesus Mamona³; Elinalva Maciel Paulo⁴; Eddy José Francisco de Oliveira⁵; Ilka Biondi⁶; Claudio Roberto Nobrega Amorim⁷.

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: casaesgabrielle@gmail.com
2. Orientador, LAPH, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: rmfsantos@uefs.br
3. Aluna de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: bjmamona@gmail.com
4. LAMASP, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: elinalvamaciell@gmail.com
5. LENT, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: eddyfo@uefs.br
6. LAPH, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ibiondi@uefs.br
7. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: amorim@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: toxinas; PCR; identificação.

INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* faz parte da microbiota residente do lúmen intestinal de diversos vertebrados e normalmente não causa dano ao indivíduo. Entretanto cepas patogênicas podem causar enfermidades como a colibacilose, que é causada pela *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (STELLA, 2009). A colibacilose é considerada uma das enfermidades que mais acomete bezerros neonatos e é uma das principais causas de mortalidade bovina em juvenis (SOUSA *et al.*, 2000). Segundo Oliveira Filho (2006), o quadro diarreico que se apresenta na colibacilose apresenta dentre outros os seguintes mecanismos: decréscimo ou danos na superfície absorptiva, aumento do número de partículas osmoticamente ativas dentro do lúmen intestinal e aumento da secreção de soluto e água. A ETEC tem como principal característica a produção de duas toxinas: a termoestável (ST) e a termolábil (LT), além de adesinas como F41, F5 e F17. Esses fatores de virulência permitem a colonização do trato intestinal e a proliferação bacteriana, tendo como consequência a diarreia (NATARO & KAPER, 1998).

Objetivou-se com esse trabalho, identificar via PCR os fatores de virulência de *E. coli* patogênica em amostras de fezes de bezerros neonatos diarreicos do Recôncavo Baiano e otimizar um método de extração bacteriana utilizando reagentes de baixo custo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostragem e identificação bioquímica

Foram utilizadas 25 amostras de fezes diarreicas de bezerros neonatos cedidas pelo professor Joselito Nunes, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal

do Recôncavo Baiano. O isolamento e identificação das amostras foram realizados no Laboratório de Microbiologia Aplicado à Saúde (LAMASP), da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). A análise molecular foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular integrado ao Laboratório de Animais Peçonhentos (LAPH) da UEFS. As amostras foram previamente diluídas em meio Tampão pH 7,4 e inoculadas em caldo BHI. Em seguida, sofreram uma bateria de testes bioquímicos que envolveram: fermentação de lactose, descarboxilação de lisina, motilidade, produção de Indol, produção de Sulfeto de hidrogênio, produção de urease, vermelho metila, Voges Proskauer e utilização de citrato como fonte de carbono.

2. Métodos de extração do DNA bacteriano

a. PureLink® Genomic DNA Mini Kit

Foram escolhidas aleatoriamente duas amostras para a extração: 3399(5) e 3376(4), além de todas as amostras padrão para os fatores de virulência: 5677 STa+, STa+/LT+, Pc LTIIa, Pc LTIIc, F17, F41 e F5(K99). A metodologia dessa extração seguiu o manual disponibilizado pelo próprio kit.

b. Fervura

Foram pipetados 1mL das amostras de *E. coli* inoculadas em BHI em tubos eppendorfs e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e o ressuspendido em PBS. Em seguida o tubo foi centrifugado e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspendido em água destilada estéril e fervido em banho maria a 100°C por 10 minutos. Após a fervura, o tubo foi centrifugado e o sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf estéril.

3. Quantificação do DNA extraído

Foi realizado uma eletroforese em gel de agarose a 1 % corado com GelRed (Biothium). Quantificação do DNA obtido foi estimada por comparação de bandas utilizando um padrão de 100ng de Lambda DNA (Thermo Scientific). Para visualização foi usado sistema de fotodocumentação (Analítica).

4. Reação da PCR

Cada reação de amplificação conteve um volume final de 20µL, onde: 2µL de TPO (10x), 0,8µL de MgCL₂ (50mM), 1,6µL de DNTP (2,5mM), 2µL de *primer* F (2pMol), 2µL de *primer* R (2pMol), 0,5µL de Taq DNA polimerase (1U/µL), 1µL de DNA (10ng/µL) e 10,1µL de água Mili Q. A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e um ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, onde cada poço apresentou: 10µL da reação da PCR, 3µL de corante e 2µL de GelRed (Biothium).

As seqüências de bases dos *primers* utilizados para identificação das toxinas e fimbrias, temperatura de anelamento, tamanho do produto esperado e a referência, são apresentados na Tabela 1.

5. PCR de efetividade dos métodos de extração

Utilizou-se as amostras padrão F41, F17, 5677 STa+, STa+/LT+, PcLTIIa e PcLTIIc da extração por fervura e da extração PureLink® Genomic DNA Mini Kit. A bioquímica utilizada para reação de amplificação foi a mesma tanto para as toxinas quanto para as fimbrias e conteve um volume final de 20µL, onde: 2µL de TPO (10x), 0,8µL de MgCL₂ (50mM), 1,6µL de DNTP (2,5mM), 2µL de *primer* F (2pMol), 2µL de *primer* R (2pMol), 0,5µL de Taq DNA polimerase (1U/µL), 1µL de DNA (10ng/µL) e 10,1µL de água Mili Q. O programa do termociclador houve variação, a amplificação das fimbrias foi realizada

sob as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e um ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos. A amplificação das toxinas foi realizada sob as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um ciclo de extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biothium).

Tabela 1. Lista dos *primers* específicos utilizados para detecção de bactérias patogênicas por PCR

Toxina/ Fimbria	Sequência	Tamanho	°C	Referência
STa 1	5-GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA-3 5-AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA-3	190	50	Sekizaki <i>et al.</i> (1985)
STa 2	5-AAAGGAGAGCTTCGTCACATTTT 3' 5- AATGTCCGTCCTGCTTTAGGAC 3'	190	50	Drumond <i>et al.</i> (2018)
LT	5-GGCGAGAGATTATAACCGTGC 3' 5-CGGTCTCTATATCCCCTGTT 3'	820	50	Drumond <i>et al.</i> (2018)
F5	5-TATTATCTTAGGTGGTATGG-3 5-GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTTC-3	314	50	Roosendaal <i>et al.</i> (1984)
F41	5-GCATCAGCGGCAGTATCT-3 5-GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT-3	380	56	Fidock <i>et al.</i> (1989)
F17	5-GGGCTGACAGAGGAGGTGGGGC 5-CCCGGCGACAACCTTCATCACCGG	411	60	Picco <i>et al.</i> (2015)
V4/V5	5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA 5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT	400	50	Parada <i>et al.</i> (2015)

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Das 25 amostras de fezes diarreicas de bezerros neonatos, 7 amostras (3776, 3399, 3350, 3718, 3376, 3247, 3680) passaram pelos testes bioquímicos e foram selecionadas para genotipagem. Diversos testes de otimização da reação foram realizados, visando padronização dos primers e quantidade de DNA utilizado na reação. Os primers para amplificação das toxinas STa1 e STa e para as fímbrias F5, F17 e F41 foram otimizadas e apresentaram amplicons compatíveis com os tamanhos das regiões alvos (Figura 1). Além disso, foi provado que o método de fervura pode ser usado na amplificação dessas regiões e ser utilizado neste sistema de detecção molecular (dados não mostrados).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em função da interrupção do experimento por causa da pandemia causada pelo SARS-CoV-2, não foi possível realizar a genotipagem das amostras e finalizar o trabalho proposto no plano de trabalho. Foi observado que uso do método de fervura permite que grandes quantidades de extrações de DNA de *E. coli* sejam feitas de forma rápida e com um custo extremamente baixo. Foi obtido sucesso na padronização e otimização dos *primers* para toxinas e fímbrias, o que irá permitir o uso desse sistema de detecção molecular de *E. coli* patogênicas em bezerros.

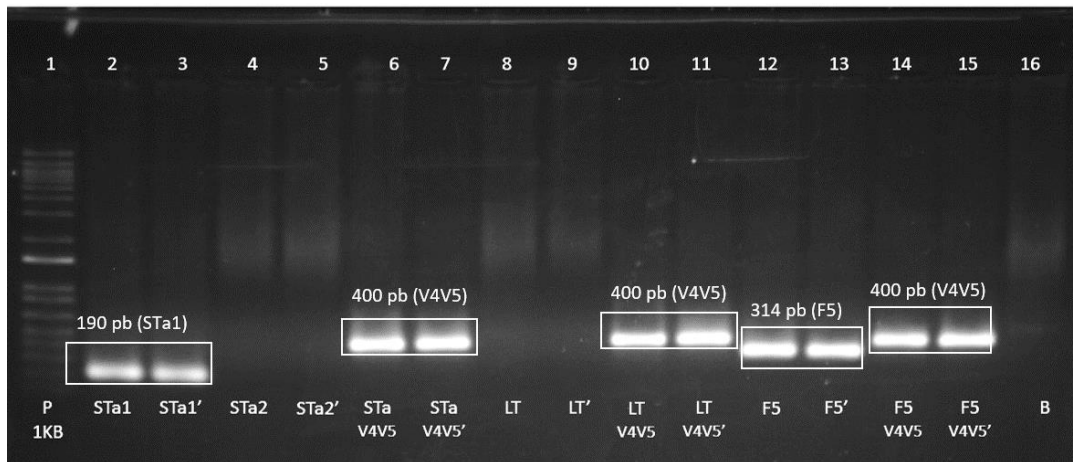


Figura 1: Eletroforese da PCR dos *primers* resintetizados e V4V5 utilizando DNA extraído com Kit de extração. 1: Ladder 1KB; 2: amostra 5677 STa com *primer* STa1; 3: duplicata; 4: amostra 5677 STa com *primer* STa2; 5: duplicata; 6: amostra 5677 com *primer* V4V5; 7: duplicata; 8: amostra LTIIc com *primer* LT; 9: duplicata; 10: amostra LTIIc com *primer* V4V5; 11: duplicata; 12: amostra F5 com *primer* F5; 13: duplicata; 14: amostra F5 com *primer* V4V5; 15: duplicata. 16: branco.

REFERÊNCIAS

- DRUMOND, S. N. et al. 2018. Molecular identification of diarrheagenic *Escherichia coli* in the watershed of Xopotó River, in Alto do Rio Done, Brazil. *Eng. Sanit. Ambiental*, 23 (3): 579 -590.
- FIDOCK, D. A. et al. 1989. Nucleotide sequence of the F41 fimbriae subunit gene in *Escherichia coli* B41. *Nucleic Acids Research*, 17 (7): 2849.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B.; 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*; 11(1): 142-201.
- OLIVEIRA FILHO, J. P. 2006. Diarreia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu.
- PARADA, A. E. et al. 2015. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*, 18(5): 1403–1414.
- PICCO, N. Y. et al. 2015. Molecular screening of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from dairy neonatal calves in Cordoba province, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 47 (2): 95-102.
- ROOSEDAAL, B. et al. 1984. The nucleotide sequence of the gene encoding the K99 subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiology letters*, 22: 253-258.
- SEKIZAKI, T. et al. 1985. Nucleotide sequences of the genes for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I of bovine, avian, and porcine origins. *American Journal of Veterinary Research*. 46(4):909-912.
- SOUSA, M. V. et al. 2000. Aspectos clínicos e epidemiológicos da diarreia dos bezerros em Botucatu, SP. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* 7(2): 74-77
- STELLA, A.E.; 2009. Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto- SP, Brasil. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP. São Paulo.