



**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**

## **XXVI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2022**

### **FREQUÊNCIA RELATIVA DE FÍMBRIAS EM AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE ÁGUA USADA PARA DESSEDENTAÇÃO DE BOVINOS EM SÃO GONÇALO DOS CAMPOS, BAHIA**

**Natsumi Mizogami Santana; Claudio Roberto Nobrega Amorim**

1. Bolsista FAPESB, Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [mizogami.10@gmail.com](mailto:mizogami.10@gmail.com)
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [amorim@uefs.br](mailto:amorim@uefs.br)

**PALAVRAS-CHAVE:** diarreia bovina; *E. coli*; fimbria

#### **INTRODUÇÃO**

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa presente no intestino de aves e mamíferos, geralmente sem causar danos ao hospedeiro (Croxen *et al.*, 2013). Entretanto, a combinação de fatores de virulência, ou seja, de moléculas que facilitam a permanência e induzem modificações danosas ao tecido do hospedeiro, pode conferir ao microrganismo a capacidade de causar infecções, limitadas ou não ao intestino (Kaper, Nataro & Mobley, 2004).

Nesse cenário, a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), caracterizada pela expressão de enterotoxinas e/ou adesinas, é uma das causadoras mais comuns da diarreia em bezerros (Dubreuil, Isaacson & Schifferli, 2016).

A adesina é uma estrutura proteica responsável pela ligação da bactéria aos receptores específicos expressos no tecido do hospedeiro. Dessa maneira, determina o sítio da infecção e permite a resistência ao peristaltismo do intestino, possibilitando a ação das enterotoxinas, que provocam diarreia pela alteração nos canais iônicos dos enterócitos (Coura, Lage & Heinemann, 2014). Portanto, a adesina é um importante fator de virulência na diarreia causada por ETEC, sendo que em bezerros as adesinas fimbriais F5, F17 e F41 são as mais comumente encontradas (Picco *et al.*, 2015).

A diarreia em bezerros é uma doença multifatorial que além da diversidade de agentes etiológicos, está sob interferências ambientais e nutricionais (Cho & Yoon, 2014). Entre eles, a água representa uma possível via de transmissão e, portanto, deve ser ofertada em quantidade e qualidade adequada para garantir a produtividade da criação (Pereira, Paterniani & Demarchi, 2009).

Levando em consideração a escassez de dados sobre o perfil de virulência da *E. coli* presente na Bahia e o impacto da bovinocultura para a economia local, o trabalho teve como objetivo a determinação da frequência relativa de fimbrias F5, F17 e F41 em colônias de *E. coli* isoladas de amostras de água coletadas de fontes utilizadas para dessedentação de bovinos em uma fazenda localizada em São Gonçalo dos Campos, Bahia.

## MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

As amostras de água foram coletadas em sete pontos utilizados para a dessedentação de bovinos em uma fazenda localizada no município de São Gonçalo dos Campos, Bahia, seguindo a metodologia definida por Brasil (2013).

As etapas de isolamento, identificação e extração de DNA foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Saúde Pública (LAMASP) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), enquanto que a detecção molecular dos genes fimbriais foi realizada no Laboratório de Entomologia (LENT), da mesma instituição.

Para o isolamento de colônias de *E. coli*, uma alíquota de cada amostra de água foi inoculada em caldo EC e incubada durante 24h a 45°C. Em seguida, foi realizada a semeadura por esgotamento de inóculo em ágar MacConkey, e as colônias suspeitas para *E. coli* seguiram para os testes bioquímicos.

O DNA foi extraído com base no método de fervura descrito por Blanco *et al.* (1997), com algumas modificações: as culturas identificadas foram semeadas em meio BHA (2%) e incubadas a 37°C por 24h. As colônias foram transferidas para os microtubos e após fervura durante 5 minutos, as amostras foram incubadas em gelo por tempo igual, e em seguida, centrifugadas a 10.192 RCF durante 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi precipitado pela adição de isopropanol na proporção 4:3, respectivamente. Após homogeneização, as amostras foram incubadas durante 30 minutos no freezer e centrifugadas a 19.975 RCF por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os microtubos permaneceram abertos até a secagem do *pellet*. Por fim, o *pellet* foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE 1X (Tris/HCl/EDTA, pH 8,0).

A qualidade e a quantidade do DNA foram mensurados por meio do espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific), além da verificação da integridade por meio da eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v). Ainda, a viabilidade para a realização de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com o DNA extraído foi avaliado pela amplificação do fragmento V4 do gene 16S rRNA, universal para bactérias, utilizando os *primers* 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), com tamanho do produto estimado em 300-350 pb (Caporaso *et al.*, 2011).

A detecção das fimbrias F5, F41 e F17 foi realizada por meio da PCR utilizando os seguintes *primers*:

Fimbria	Sequência do <i>primer</i> (5'--3')	Tamanho do fragmento esperado(pb)	Fonte bibliográfica
F5	5'-TATTATCTTAGGTGGTATGG-3' 5'-GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTTC-3'	314	Roosendaal, Gaastra & De Graaf (1984)
F41	5'-GCATCAGCGGCAGTATCT-3' 5'-GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT-3'	380	Fidock, Menicholas & Lehrbach (1989)
F17	5'-GGGCTGACAGAGGAGGTGGGGC-3' 5'-CCCGCGCAACTTCATCACCGG-3'	411	Picco <i>et al.</i> (2015)

O *mix* foi preparado a partir de 2 µL de tampão (10X), 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,6 µL de dNTP (2,5mM), 2µL de *primer* F (10 pmol/µL), 2µL de *primer* R (10 pmol/µL),

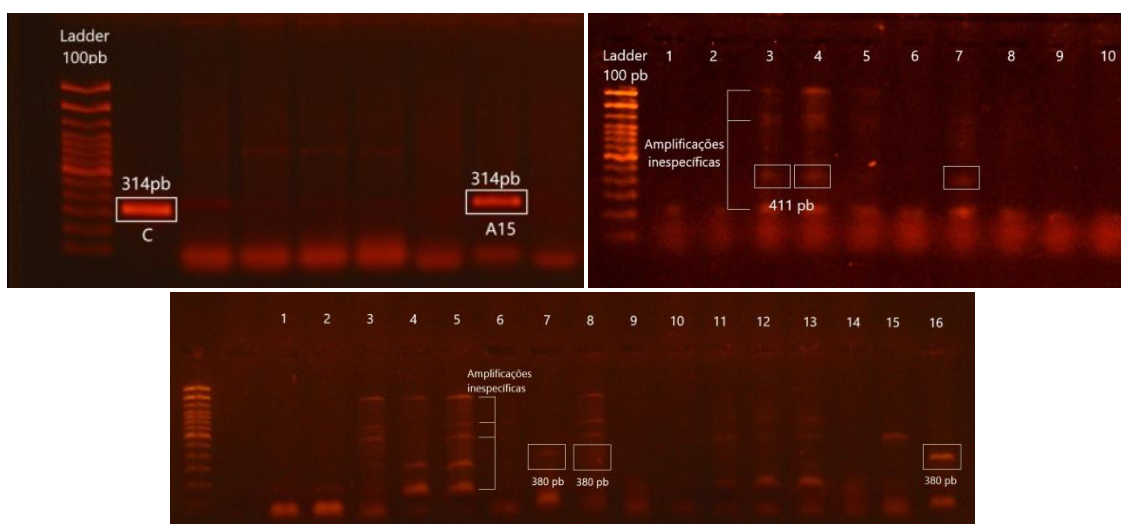
0,1 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e 10,5 µL de água ultrapura. Com a adição de 1 µL de DNA (50 ng/µL), o volume final de cada tubo foi ajustado para 20 µL.

O programa do termociclador consistiu em 94°C por 5 minutos de desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 5 minutos. E, por último, um ciclo de extensão final a 72°C durante 5 minutos.

O produto da PCR seguiu para eletroforese utilizando agarose 2% (p/v) com tampão TBE 1X (Tris/Borato/EDTA, pH 8,0), sob 100 volts de potência durante 50 minutos. Cada poço foi preenchido por 5µL do produto da PCR, 2µL de GelRed (10X) e 5 µL de tampão de carregamento. As bandas foram registradas por fotodocumentador.

## RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Foram identificadas 50 colônias de *E. coli*, das quais 34% apresentaram gene para fímbria F17. Já a frequência relativa da fímbria F5 foi de 13,04% em 46 amostras analisadas, e F41 foi detectado em 23,53% das 17 amostras.



**Figura 1:** Resultado da PCR do gene da fímbria F5. C – Controle positivo; A15- amostra positiva.

**Figura 2:** Resultado da PCR do gene da fímbria F17. 1-10: Amostras A1-10.

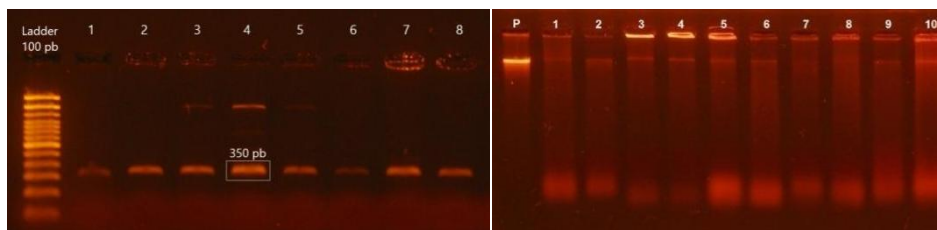
**Figura 3:** Resultado da PCR do gene da fímbria F41. 1-16: Amostras A1-16.

Houve formação de bandas inespecíficas na amplificação dos genes das fímbrias F17 e F41, mesmo após ajustes de variáveis nos ciclos de amplificação e concentração dos reagentes. Entretanto, foi possível obter bandas de tamanho esperado entre as inespecíficas. Sendo assim, estas foram consideradas amostras positivas.

A frequência relativa de F5 foi superior ao encontrado pelo estudo de Umpiérrez *et al.* (2021), realizado com amostras de fezes diarreicas em bezerros com menos de 35 dias de vida. A frequência relativa de F17 é similar ao encontrado por Ryu *et al.* (2020) em fezes diarreicas de bezerros de até 31 dias de vida, enquanto que a de F41 é superior em comparação com os trabalhos de Ryu *et al.* (2020) e Umpiérrez *et al.* (2021), 0% e 3,4%, respectivamente.

Em relação à qualidade do DNA extraído, houve formação de banda única na eletroforese, indicando que o DNA permaneceu íntegro após o processo de fervura e limpeza. Da mesma forma, foi possível observar a viabilidade das amostras para a aplicação na PCR, com amplificação da região V4 de 16S rRNA. As amostras tiveram

concentração acima de 200 ng/μL na espectrofotometria, com 68,75% das amostras apresentando valor de 260/280 acima de 1,80, considerado DNA puro.



**Figura 1:** Resultado da PCR para região V4 do gene ribossomal 16S. 1-8: Amostras A1-A8.

**Figura 2:** Eletroforese das amostras de DNA extraídas. P – DNA padrão com concentração de 200ng; 1-10: amostras A1-A10.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

O DNA extraído pelo método de fervura se mostrou viável para amplificação por meio da PCR, sendo uma alternativa mais econômica e prática de extração do material genético para detecção molecular de fatores de virulência.

Conclui-se que há uma frequência relativamente alta de *E. coli* produtora de fimbrias e há a necessidade de um estudo mais aprofundado a fim de entender melhor o perfil de virulência das colônias encontradas no Estado.

### REFERÊNCIAS

- BLANCO, M. *et al.* 1997. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesions and production of toxins. *Res. Microbiol.* 148(9): 745-755.
- BRASIL. 2013. *Manual prático de análise de água*. Funasa, Brasília, 150 p.
- COURA, F.M.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B. 2014. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. *Pesq. Vet. Bras.* 34(9): 811-818.
- CHO, Y.; YOON, K. 2014. An overview of calf diarrhea: infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J. Vet. Sci.* 15: 1-17.
- CROXEN, M. *et al.* 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26(4): 822-880.
- DUBREUIL, J.D.; ISAACSON, R.E.; SCHIFFERLI, D.M. 2016. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* 7(1): 1-47.
- FIDOCK, D.A.; MCNICHOLAS, P.A.; LEHRBACH, P.R. 1989. Nucleotide sequence of the F41 fimbriae subunit gene in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 17(7): 249.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(2):123-140.
- PEREIRA, E.R.; PATERNIANI, J.E.S. DEMARCHI, J.J.A.A. 2009. A importância da qualidade da água de dessedentação animal. *BIOENG* 3(3): 227-235.
- PICCO, N.Y. *et al.* 2015. Molecular screening of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from dairy neonatal calves in Cordoba province, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 47(2): 95-102.
- ROSENDAL, B.; GAASTRA, W.; DE GRAAF, F.K. 1984. The nucleotide sequence of the gene encoding the K99 subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 22(3): 253-258.
- RYU, J. *et al.* 2020. Characterization of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from pre-weaned calves in the Republic of Korea. *Acta Vet. Scand.* 62(45):1-7.
- UMPIÉRREZ, A. *et al.* 2021. Virulence genes of *Escherichia coli* in diarrheic and healthy calves. *Rev. Argent. Microbiol.* 53(1): 34-38.