



PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE LEITE CRU REFRIGERADO DA REGIÃO CENTRAL DO PARANÁ

Silva, F.F.^{1*}; Ribeiro Junior, J.C.¹; Garcia, L. N. H.¹; Oliveira, A. M.¹; Silva, F. G.¹; Augusto, A. N.¹; Teider Junior, P. I.¹; Beloti, V.¹

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. *e-mail: francinefvvet@hotmail.com

Saúde única

Palavras-chave: *Escherichia coli*, toxina Shiga, gene *eae*.

Introdução

A presença de *Escherichia coli* em um alimento indica contaminação microbiana de origem fecal, demonstrando condições higiênicas insatisfatórias. Outro aspecto a ser considerado é que alguns isolados de *E. coli* apresentam fatores de virulência que os tornam capazes de causar infecção intestinal. Esses fatores precisam ser pesquisados para que seja possível relacionar um alimento contaminado com *E. coli* como causa de infecção gastrointestinal. *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) é uma importante causa de doença gastrointestinal em humanos, e pode resultar em sequelas com risco de vida como síndrome hemolítica urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica (PATON E PATON, 1998). *E. coli* enteropatogênica atípica (EPEC) para humanos carregam o gene *eae*, responsável pela produção de uma adesina conhecida como íntima, causadora da lesão chamada *attaching and effacing* (A/E) (PATON E PATON, 1998), que causa uma dramática perda das vilosidades dos enterócitos (DONNENBERG et. al., 1992). *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que pode causar colite hemorrágica (CH), é produtora de toxina Shiga, portadora do gene *eae* e também apresenta gene para produção de hemolisina (PATON E PATON, 1998). O sorotipo de EHEC mais importante é O157:H7, mas outros sorotipos já foram descritos como produtores de citotoxinas (FRANCO E LANDGRAF, 2008).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* de cepas de *E. coli* isoladas de amostras de leite cru refrigerado.

Material e métodos

Foram coletadas 20 amostras de leite cru refrigerado produzido nos municípios de Castro e Arapoti, região central do estado do Paraná, no período de novembro de 2013 a março de 2014. Todas as propriedades selecionadas tinham alto nível de tecnificação, com produção média diária de 5 a 29 mil litros/dia. O abastecimento de água de todas as propriedades era oriundo de poço artesiano próprio, a ordenha era realizada em circuito fechado, sendo uma robotizada, e em seis propriedades o leite



cru passava por um resfriador em placas antes de ser armazenado em tanques de expansão.

Amostras de 500 mL de leite cru refrigerado foram coletadas de maneira asséptica diretamente dos tanques de expansão das propriedades rurais, transportadas sob refrigeração ao Laboratório de Inspeção de produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), onde se procederam as análises.

As amostras de leite cru refrigerado foram avaliadas para pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* através do método rápido Petrifilm EC 3M™. As amostras foram inoculadas e incubadas de acordo com as instruções do fabricante. Os isolados caracterizados como *E. coli* foram repicados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, posteriormente acondicionadas em microtubos previamente esterilizados com 50% de glicerina e estocados a -20°C .

A partir do estoque, as amostras foram repicadas para caldo BHI, incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Em seguida, semeadas em Ágar Padrão para Contagem, incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Foi escolhida uma colônia isolada e novamente repicada para caldo BHI, de onde foi retirada a amostra para extração de DNA por fervura segundo Ribeiro Junior et al. (2016).

A detecção dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (PATON E PATON, 1998) independentes. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídio.

Resultados e Discussão

Das 20 amostras, 14 (70%) apresentaram crescimento de colônias de *E. coli*, com total de 34 colônias isoladas. Os genes *stx1* e *stx2* não foram observados em nenhuma dos isolados analisados. Timm et al. (2005) também não identificou esses mesmos genes em isolados de *E. coli* em carne moída e leite cru.

Do total de isolados analisados, cinco (14,70%) apresentaram gene *eae*, o que caracteriza a presença de EPEC. Não foi possível diferenciar se os isolados eram de EPEC típica ou atípica porque o gene *bfpA* e a sequência EAF, presentes na *E. coli* típica, não foram pesquisados.

Uma vez que a presença de *E. coli* nos alimentos indica contaminação de origem fecal, é possível afirmar que amostras de leite que compuseram esse estudo apresentavam risco da presença de outros enteropatógenos como *Salmonella*, além dos isolados de *E. coli* diarreiogênicos identificados. Vários surtos de CH e SHU foram confirmados através do consumo de carne bovina e do leite (DONNENBERG, 1992). O consumo destes alimentos mal cozidos ou crus é responsável por esses surtos (TIMM et al., 2005). Ruminantes domésticos, especialmente bovinos e ovinos, são portadores assintomáticos, destacando-se como os principais reservatórios de STEC, que causam infecções em humanos (BLANCO et al., 2003).



Conclusão

O isolamento de *E. coli* diarreio gênica em amostras de leite cru refrigerado produzidas em municípios paranaenses alertam para um problema que ainda ocorre no estado do Paraná, que é a comercialização de leite cru e a produção de derivados feitos com leite cru, o que pode oferecer risco aos consumidores destes produtos.

Referências

- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, M.P.; GONZÁLEZ, E.A.; BLANCO, J. *Escherichia coli* verotoxigênicos (ECVT) en España. 2004. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/10826206_Verotoxin_Producing_Escherichia_coli_in_Spain_Prevalence_Serotypes_and_Virulence_Genes_of_O157H7_and_Non_O157_VTEC_in_Ruminants_Raw_Beef_Products_and_Humans>. Acesso em: 03 de agosto de 2016.
- DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 60, n. 10, p. 3953, 1992.
- FRANCO, B. D. G. e LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.
- GANNON, V.P.J.; RASHED, M.; KING, R.K.; THOMAS, E. J. G. Detection and Characterization of the *eae* Gene of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* Using Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 31, n. 5 jul. 1993, p. 1268-1274
- PATON, A.W. e PATON, J.C. Detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E.coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, p. 598–602, 1998.
- RIBEIRO JUNIOR, J. C.; TAMANINI, R.; SOARES, B. F.; OLIVEIRA, A. M.; SILVA, F. G.; SILVA, F. F.; AUGUSTO, A. N.; BELOTI, V. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. **Semina Ciências Agrárias**. v. 37, n. 5. set./out. 2016
- TIMM, C.D.; CONCEIÇÃO, F.R.; MENIN, A.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; DELLAGOSTIN, O.A.; ALLEIXO, J.A.G. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Southern Brazil isolated from ground beef and milk. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, p. 641-646, abr./jun. 2009.