

PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* PATOGENICA EXTRA-INTESTINAL EM ISOLADOS DE QUEIJOS A BASE DE LEITE NÃO PASTEURIZADO

SEARCH OF VIRULENCE GENES FROM PATHOGENIC EXTRAIESTINAL *Escherichia coli* IN ISOLATES FROM CHEESES MADE WITH UNPASTEURIZED MILK

Laryssa Freitas Ribeiro¹, Mayhara Martins Cordeiro Barbosa², Fernanda de Rezende Pinto³, Viviane de Souza⁴, Mônica Costa Oliveira¹, Lucimara Antônio Borges¹, Luiz Augusto do Amaral¹, John Morris Fairbrother⁵

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, câmpus de Jaboticabal.

² Doutoranda do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP - Jaboticabal)

³ Médica Veterinária, Professora Adjunto do Departamento de de Veterinária Preventiva - Faculdade de Veterinária - UFPel

⁴ Médica Veterinária, Pesquisadora Embrapa Caprinos e Ovinos - Sobral/CE

⁵ Médico Veterinário, Professor do Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.

Palavras chave: *Escherichia coli* extra-intestinal, queijos, genes de virulência, leite não pasteurizado.

Introdução

A produção de queijos a partir de leite não pasteurizado é uma das formas mais antigas de conservação do leite, sendo muito aceita no mercado, tanto pelo seu valor nutritivo, quanto pelo sabor. O queijo, por apresentar relevantes teores de lipídios, proteínas, minerais e vitaminas, é considerado um alimento completo e importante na alimentação humana e o seu sabor atende aos mais exigentes paladares.

Essa atividade, de importância econômica e social, é exercida por inúmeros pequenos produtores de forma artesanal, a partir de leite cru, e muitas vezes, sem os devidos cuidados higiênicos tanto no processamento, armazenamento e comercialização, tornando-o impróprio para o consumo. As péssimas condições de fabricação, a falta ou ineficiência do sistema de refrigeração ao longo de toda a cadeia, além de outras fontes como baldes, bacias, peneiras, panos de prato, sal, material de embalagem, entre outros são exemplos da facilidade de contaminação desse produto, principalmente por microrganismos como *Escherichia coli*.

A infecção causada por *Escherichia coli* patogenicidade extra-intestina (ExPEC) não tem chamado a atenção pública como a infecção causada por *E. coli* patogenicidade intestinal, isto porque em contraste com a *E. coli* O157:H7, a infecção por ExPEC não ocorre de forma epidêmica e sim de forma discreta, aparentemente não é proveniente de alimento contaminado e muitas vezes, causa somente uma pequena morbidade no hospedeiro ou um leve comprometimento, sendo assim a infraestrutura da saúde pública trabalha constantemente para detectar as infecções causadas por *E. coli* patogenicidade intestinal tornando-as notória, enquanto que as infecções causadas por ExPEC não são citadas ou dada a devida importância (JOHNSON & RUSSO, 2002). ExPEC são importantes porque causam infecção do trato urinário, meningite, septicemia e pneumonia em humanos. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a presença de *E. coli*

patogênica extra-intestinal em queijos a base de leite não pasteurizados e verificar possíveis riscos à saúde humana.

Materiais e métodos

Vinte amostras de cada cidade, totalizando 60 amostras de queijos a base de leite não pasteurizado foram coletadas aleatoriamente em três locais: mercado municipal da cidade de Ribeirão Preto, SP, supermercado na cidade de Sacramento, MG (queijo tipo Minas Artesanal autorizado para venda pelo Instituto Mineiro Agropecuário e queijo comercializado por ambulantes na cidade de Aracaju, SE. Todas as amostras estavam no prazo de validade e foram coletadas segundo APHA (2001). Das amostras colhidas foram transferidas 25 gramas de cada para sacos plásticos esterilizados contendo 225 mL de água peptonada 0,1% esterilizada. Dessa mistura, 1,0 mL foi transferido para um tubo contendo caldo BHI e posteriormente incubados a 37°C por 24 horas. Em seguida, uma alíquota do caldo BHI foi semeada. Em placas de Petri contendo ágar Mac Conkey, as quais foram incubadas a 37°C por 24 horas. Cinco colônias características de cada amostra foram semeadas em tubos contendo ágar TSA e mantidos a 37°C por 24 a 48 horas. Os isolados foram enviados em ágar nutriente para o Laboratório de *Escherichia coli* da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada. Do ágar nutriente, uma alçada foi semeada para o ágar TSA. A partir do ágar TSA, uma alçada foi semeada em tubo de ensaio contendo 2 mL de caldo LB (Luria Bertoni), e incubado em estufa a 37°C overnight. Em seguida a cultura foi transferida para um tubo plástico tipo eppendorf e centrifugada a 12000 rpm por 2 minutos para a precipitação das células e descarte do sobrenadante. As células precipitadas foram ressuspensas em 1000µL de PBS (phosphate buffer saline) estéril e agitada em vórtex até completa diluição do “pellet”. A cultura bacteriana foi novamente precipitada e foi descartado o sobrenadante igual descrito anteriormente. Em seguida, 500µL de água ultrapura estéril foram adicionados e o tubo foi agitado em vórtex até dissolver o “pellet”. A extração do material genético das bactérias foi realizada por fervura a 100°C. Para isso, o tubo plástico tipo eppendorf contendo a cultura foi colocado por 10 minutos em água fervente (100° C). Após esse tempo, as células foram precipitadas por centrifugação a 12000 rpm durante dois minutos e uma alíquota de 400 µL foi retirada do sobrenadante e transferido para outro tubo plástico tipo eppendorf. Esse material foi estocado em freezer a -20° C e mantido até o momento de uso. O material genético das amostras de *E. coli* foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) do tipo multiplex utilizando-se um conjunto de primers específicos para amplificação (Tabela 1), e para controle positivo, utilizou-se a cepa de *E. coli* padrão 13421 e 3110 (Laboratório de *Escherichia coli* da Universidade de Montreal).

Para a reação de PCR, foi utilizado um volume de 25µL contendo: 5µL de DNA molde; 2,5 mL de solução de dNTPs (2mM); 1,25µL de cada iniciador a 10µM ; 0,2µL da enzima Taq DNA polimerase (5U/µL) ; 2,5µL de solução tampão para a reação de PCR com MgCl₂ (10X) e o restante de água destilada milique previamente esterilizada.

As misturas foram submetidas a um termociclador a 94°C por 2 minutos (desnaturação); seguido de 25 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), temperatura de pareamento específica para cada primer por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos (extensão). O último ciclo foi realizado a 72 °C por 10 minutos para completa extensão da Taq DNA polimerase. Uma alíquota desta reação contendo apenas água, sem DNA, foi usada como controle negativo. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,8%, corado com Safe Imager 2.0 Blue-Light Transilluminator (Invitrogen). Foi usado como referência um marcador de peso molecular conhecido (100 pb DNA Ladder - Invitrogen).

Os genes de virulência de *E. coli* ExPEC verificados foram CNF, PapC, iucD e Tsh (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos iniciadores para os genes CNF, PapC, iucD, Tsh, tamanho do produto de amplificação e sua respectiva temperatura de pareamento

Iniciador	Seqüência do Oligonucleotídeo (5´-3´)	Referência	Produto de amplificação (pb)	Temperatura de pareamento (°C)
CNF For	TCGTTATAAAATCAAACAGTG	Ewers et. al, 2004	446	60
CNF Rev	CTTTACAATATTGACATGCTG			
Pap C For	TGATATCACGCAGTCAGTAGC	Janssen et. Al, 2001	501	
Pap C Rev	CCGGCCATATTCACATAAC			
iucD For	AAGTGTCGATTTTATTGGTGTA	Herrero et. al, 1988	778	55
iucD Rev	CCATCCGATGTCAGTTTTCTG			
Tsh For	GGTGGTGCAGTGGAGTGG	Dozois et. al, 2000.	640	
Tsh Rev	AGTCCAGCGTGATAGTGG			

Resultados e discussão

Dos 169 isolados de *Escherichia coli* obtidos a partir das 60 amostras de queijo, 17 eram ExPEC (10,06%), sendo 14 possuíam o gene Tsh, 1 iucD, 1 Tsh e iucD e 1 Pap C A figura 1 mostra o gel de eletroforese do PCR para os genes iucD, Tsh, PapC e CNF.

Dos 51 isolados de Uberaba, 5 (9,8%) eram ExPEC (1 possuía o gene iucD e 4 Tsh). Em Aracajú, dos 93 isolados, 12 (12,9%) era positivos para ExPEC (1 PapC, 10 Tsh e 1 iucD e Tsh). Em Ribeirão Preto, nenhum dos 25 isolados possuía gene para ExPEC.

A ExPEC foi predominantemente encontrada nos isolados das amostras do estado de Sergipe, não sendo encontrado nos isolados do estado de Ribeirão Preto (Figura 2). O gene Tsh foi o de maior prevalência (10,05%).

JOHNSON et al. (2005) estudaram 346 itens alimentares (vegetais, produção, carne bovina, carne de porco, carne de frango e carne de peru) de 16 diferentes supermercados em Minneapolis (Estados Unidos) e encontraram 12 ExPEC e eles sugerem que os alimentos realmente são fonte de contaminação de ExPEC para humanos.

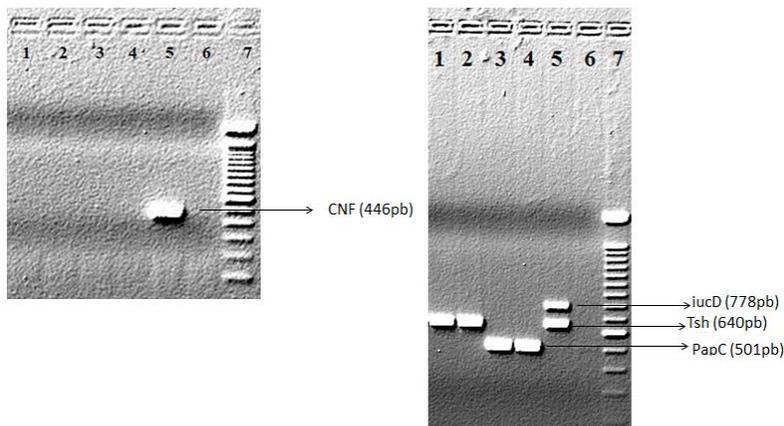


Figura 1. Gel de eletroforese do PCR de amostras para detecção de genes de virulência para ExPEC.

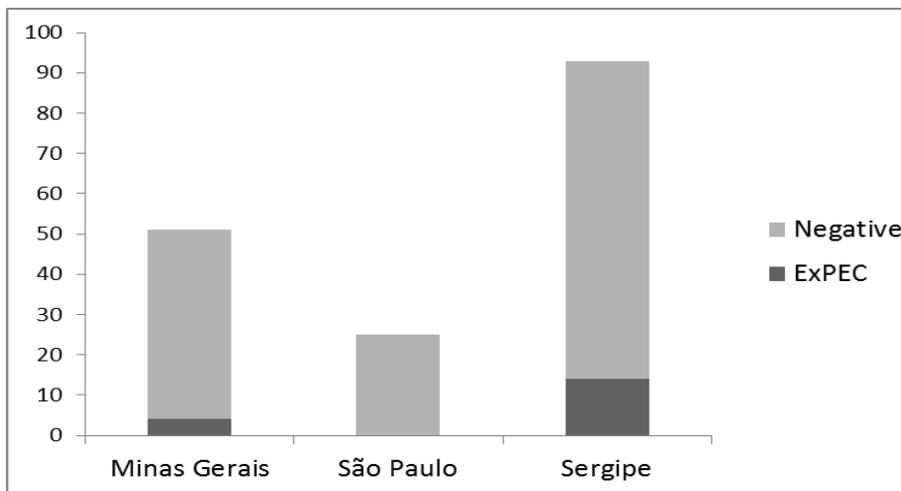


Figura 2. Isolados positivos e negativos para ExPEC em Minas Gerais, São Paulo e Sergipe

Conclusão

A partir dos resultados foi possível concluir que há má condição higiênica na produção dos queijos. A presença de genes de virulência de ExPEC em queijos provenientes de leite cru, podendo causar risco à saúde dos consumidores, infecção do trato urinário, meningite, septicemia e pneumonia em humanos, sendo um problema de ordem pública. É, portanto, necessária uma maior fiscalização durante todo o processo de fabricação destes queijos, pois esses podem apresentar riscos aos consumidores.

Bibliografia

Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss. 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region. *Infect. Immun.* 68:4145-4154

Ewers, C., Janssen, T., Kiessling, S., Philipp, H.C., Wieler, L.H., 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet. Microbiol.* 104, 91–101.

Herrero, M., V. Delorenzo, and J. B. Neilands. 1988. Nucleotide-Sequence of the *lucD* Gene of the *Pcolv-K30* Aerobactin Operon and Topology of Its Product Studied with *Phoa* and *LacZ* Gene Fusions. *J. Bacteriol.* 170:56-64

Janssen, T., Schwarz, C., Preikschat, P., Voss, M., Philipp, H.C., Wieler, L.H., 2001. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 371–378.

JOHNSON, J. R.; DELAVARI, P.; O'BRYAN, T. T.; SMITH K. E.; TATINI, S. Contamination of Retail Foods, Particularly Turkey, from Community Markets (Minnesota, 1999–2000) with antimicrobial-Resistant and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, Number 1, 2005.

JOHNSON, J.R., RUSSO, T. A. J., *Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: "The other bad Escherichia coli"*. *Lab, Clin. Med.*, 2002. **139**(3): p. 155-162.